

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : A61K 47/48		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/53229
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. September 2000 (14.09.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/01899		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 3. März 2000 (03.03.00)		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(30) Prioritätsdaten: 199 10 102.7 8. März 1999 (08.03.99) DE			
(71)(72) Anmelder und Erfinder: FISCHER, Markus [DE/DE]; Ruppertstrasse 10, D-80337 München (DE). BACHER, Adelbert [DE/DE]; Königsbergerstrasse 74, D-85748 Garching (DE).			
(74) Anwalt: HARTZ, Nikolai; Wächtershäuser & Hartz, Tal 29, D-80331 München (DE).			
(54) Title: PROTEIN CONJUGATES, METHODS, VECTORS, PROTEINS AND DNA FOR PRODUCING THEM, THEIR USE, AND MEDICAMENTS AND VACCINES CONTAINING A CERTAIN QUANTITY OF SAID PROTEIN CONJUGATES			
(54) Bezeichnung: PROTEINKONJUGATE, VERFAHREN, VEKTOREN, PROTEINE UND DNA ZU DEREN HERSTELLUNG, DEREN VERWENDUNG, SOWIE ARZNEIMITTEL UND IMPFSTOFFE MIT EINEM GEHALT DERSELBEN			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to protein conjugates, methods, vectors, proteins and DNA for producing them, their use, and medicaments and vaccines containing a certain quantity of said protein conjugates. According to the invention, supramolecular particles are produced that represent one or more different, randomly selectable structural units in a large number on the surface of an individual, approximately spherical protein molecule. Icosahedral lumazine synthases are used as carrier proteins for peptides or proteins. A DNA fragment that encodes a peptide molecule is fused with a DNA fragment that encodes an icosahedral lumazine synthase by molecular-biological methods. Said DNA fragment is inserted into a cloning vector and transformed with an appropriate host strain. A polypeptide is expressed by gene expression. If certain peptide structures are used as the fusion partners, a post-translational change of said structures can be observed in the host strain. The chimeric peptide is purified and chemically modified if necessary. It is possible to produce icosahedral molecules that contain up to 120 different peptide motifs on their surfaces by mixing. The compounds produced lend themselves as auxiliary agents for carrying out analytical methods (ELISA, biosensors) or for producing vaccines.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Die Erfindung betrifft Proteinkonjugate, Verfahren, Vektoren, Proteine und DNA zu deren Herstellung, sowie deren Verwendung, sowie Arzneimittel oder Impfstoffe mit einem Gehalt derselben. Sie dient zur Herstellung supramolekularer Partikel, welche eine oder mehrere unterschiedliche, willkürlich bestimmbare Struktureinheiten in grosser Anzahl auf der Oberfläche eines einzelnen, etwa kugelförmigen Proteinmoleküls präsentieren. Ikosaedrische Lumazinsynthasen werden als Trägerproteine für Peptide bzw. Proteine eingesetzt. Ein DNA-Fragment, welches für ein Peptidmolekül kodiert, wird unter Verwendung molekularbiologischer Verfahren mit einem DNA-Fragment, welches für eine ikosaedrische Lumazinsynthase kodiert, fusioniert. Das DNA-Fragment wird in einen Klonierungsvektor inseriert und in einen geeigneten Wirtsstamm transformiert. Auf dem Wege der Genexpression wird ein Polypeptid produziert. Bei der Verwendung von bestimmten Peptidstrukturen als Fusionspartner erfolgt im Wirtsstamm eine posttranskriptionale Veränderung derselben. Das chimäre Peptid wird gereinigt und bei Bedarf chemisch verändert. Des Weiteren können durch Vermischung ikosaedrische Moleküle hergestellt werden, die bis zu 120 unterschiedliche Peptidmotive auf deren Oberfläche enthalten. Die entstandenen Verbindungen eignen sich als Hilfsmittel zur Durchführung von Analysenverfahren (ELISA, Biosensoren) oder zur Herstellung von Impfstoffen.</p>			

BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Republik Korea	RO	Rumänien		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SG	Singapur		
EE	Estland	LR	Liberia				

Beschreibung

Proteinkonjugate, Verfahren, Vektoren, Proteine und DNA zu deren Herstellung, deren Verwendung, sowie Arzneimittel und Impfstoffe mit einem Gehalt derselben.

Die Erfindung betrifft Proteinkonjugate, Verfahren, Vektoren, Proteine und DNA zu deren Herstellung, sowie deren Verwendung, sowie Arzneimittel oder Impfstoffe mit einem Gehalt derselben. Die vorliegende Erfindung dient zur Herstellung supramolekularer Partikel, welche eine oder mehrere unterschiedliche, willkürlich bestimmbare Struktureinheiten in großer Anzahl auf der Oberfläche eines einzelnen, etwa kugelförmigen Proteinmoleküls präsentieren.

Eigenschaften der Lumazinsynthase und auf Lumazinsynthase basierender artifizieller Proteinkonjugate

6,7-Dimethyl-8-ribityllumazinsynthase (im Folgenden als Lumazinsynthase bezeichnet) katalysiert den vorletzten Schritt der Vitamin-B₂-Biosynthese in Mikroorganismen und Pflanzen.

Lumazinsynthasen aus bestimmten Bakterien (z.B. *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Aquifex aeolicus*) bilden hochsymmetrische, ikosaedrische Komplexe aus 60 Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von ca. 1 MDalton (Bacher und Ladenstein, 1991; Bacher et al., 1980; Ladenstein et al., 1986, 1988, 1994; Mörtl et al., 1996). Röntgenstrukturen der Kapsidhülle der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* sind bekannt (Ladenstein et al., 1988, 1994; Ritsert et al., 1995). Das Protein aus *Bacillus subtilis* kann unter Verwendung von Harnstoff denaturiert und anschließend renaturiert werden. Die Effizienz der Renaturierung lässt sich durch die Zugabe eines Liganden (Substratanalogon), beispielsweise 5-Nitro-6-(D-ribitylamino)-2,4-(1H,3H)-pyrimidindion oder 5-Nitroso-6-(D-ribitylamino)-2,4-(1H,3H)-pyrimidindion, erhöhen. Die Faltung des renaturierten Proteins ist identisch mit der Faltung der nativen Lumazinsynthase. In Gegenwart des genannten Liganden ist die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* bis pH 10 stabil. Die Umgebung des Inhibitormoleküls ist aufgrund der Röntgenstruktur bekannt. Die Bindungsstelle dieses Liganden wird aus Segmenten

benachbarter Monomeren gebildet (Bacher et al., 1986; Ritsert et al., 1995). Diese Konstellation erklärt den unterstützenden Einfluß des Liganden bei der Renaturierung des hochmolekularen Proteinkomplexes.

Lumazinsynthasen aus verschiedenen Mikroorganismen können in rekombinanten Stämmen von *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* effizient exprimiert werden. Die rekombinanten Proteine können in hoher Ausbeute isoliert werden.

Sowohl der N- als auch der C-Terminus liegen an der Oberfläche des ikosaedrischen Kapsidmoleküls. Für Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* wurde dies erstmals durch Röntgenstrukturanalyse gezeigt (Ladenstein et al., 1988). Durch DNA-Synthese konnte ein optimal an die Kodonverwendung von *Escherichia coli* angepasstes Gen zur Expression der thermostabilen Lumazinsynthase aus dem thermophilen Mikroorganismus *Aquifex aeolicus* erhalten werden. Das Protein kann in hohen Mengen rekombinant erhalten werden. Es ist bei einer Temperatur von 80 °C mindestens eine Woche stabil. Daß bei *Aquifex aeolicus* dieselben strukturellen Verhältnisse wie bei der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* vorliegen, folgt aus der Tatsache, daß Fusionsproteine mit Verlängerung des C-terminalen und/oder N-terminalen Endes zu ikosaedrischen Kapsiden assoziieren können, bzw. daß auch chimäre Proteine, bestehend aus Teilen der Lumazinsynthasen aus *Aquifex aeolicus* und *Bacillus subtilis* hergestellt werden können. Es ist folglich von einer sehr ähnlichen Quartärstruktur auszugehen.

Ikosaedrische Lumazinsynthasen können an ihrer Oberfläche mit Struktureinheiten funktionalisiert werden. Als Struktureinheiten (Biomoleküle) kommen vorzugsweise Oligo- oder Polypeptide mit frei wählbaren Segmenten in Betracht. Die präsentierten Proteine (konjugierte Biomoleküle) sind mit dem Trägerprotein kovalent verbunden (Lumazinsynthase-Konjugat). Unter einem Trägerprotein im Sinne der Erfindung versteht man eine natürliche (unveränderte) oder eine modifizierte Lumazinsynthase, bei der die Primärstruktur verändert wurde. Es können dabei eine oder mehrere Aminosäuren ausgetauscht und/oder entfernt und/oder zugefügt und/oder verändert vorliegen. Der Erhalt der ursprünglichen katalytischen Aktivität der Lumazinsynthase ist hierbei nicht erforderlich. Vielmehr können z.B. auch katalytisch inaktive, modifizierte Proteine für alle erfindungsgemäßen Anwendungen eingesetzt werden.

Die Anzahl der konjugierten Biomoleküle auf der Oberfläche des Trägerproteins kann sich über einen weiten Bereich erstrecken, wobei erfindungsgemäß die Oberfläche mit bis zu 60 (an einem Terminus) bzw. 120 (an beiden Termini) bzw. 180 (an beiden Termini plus

Schleifeninsertion) identischen oder in ihrer Struktur verschiedenen Peptidmotiven dekoriert sein kann. Proteinuntereinheiten auf der strukturellen Grundlage von Lumazinsynthase können außerdem auch zu noch größeren, etwa spärischen Partikeln und zu tubulären Strukturen assembliert werden. Diese Assoziate können weit über 60 Untereinheiten enthalten. Sie besitzen allerdings nicht die strenge, geometrische Regelmäßigkeit der ikosaedrischen, 60-meren Lumazinsynthase-Moleküle.

Die Länge der präsentierten Peptidsegmente kann über einen weiten Bereich variieren, erfindungsgemäß vorzugsweise über 1 - 500 Aminosäuren, wobei die Peptidmotive sowohl unverändert als auch modifiziert vorliegen können.

Erfindungsgemäße Proteine können auch eine oder mehrere Aminosäureanaloga oder nicht natürlich vorkommende Aminosäuren enthalten, die auf biologischem Wege (z.B. mittels Suppressor-tRNA-Techniken, etc.) oder auf chemischen Wege (z.B. über Kopplungsreagenzien, etc.) in die Sequenz eingeführt werden. Ebenso können Modifikationen (z.B. Glykosylierung, etc.) oder Derivatisierung (z.B. Biotinylierung, etc.) vorliegen.

Die zugrunde liegende genetische Information für die Spezifikation der artifiziell in die Struktur der Lumazinsynthaseuntereinheit eingebrachten Peptidabschnitte kann sich dabei von wenigen Codons bis zu mehreren Genen erstrecken, abhängig davon, ob ein Oligopeptid, ein Polypeptid oder ein aus mehreren Untereinheiten bestehendes Protein kodiert werden soll.

Die Oberfläche einer Lumazinsynthase kann auch auf chemischem Wege modifiziert werden, so daß deren Außenperipherie mit einer Vielzahl an Funktionsbereichen kovalent verknüpft ist.

Die Herstellung von heterooligomeren Lumazinsynthase-Konjugaten erfolgt über einen Dissoziationsschritt und einen nachfolgenden Faltungs/Reassoziationsschritt. Die nach der Denaturierung monomer vorliegenden chimären Proteine können beliebig gemischt werden. Da die rekombinierten Untereinheiten jeweils einen konstanten Lumazinsynthaseanteil besitzen, ist eine Renaturierung der Lumazinsynthase Kernstruktur unter Ausbildung der natürlichen ikosaedrischen Struktur möglich.

Immunologische Analysenverfahren auf der Basis des ELISA-Testsystems

Antikörper binden mit hoher Spezifität an bestimmte Zielstrukturen (Antigene). Es wurden Testverfahren entwickelt, die auf dem Nachweis spezifischer Antikörper-Antigen-Komplexe basieren. Um festzustellen, ob ein Antikörper an sein Zielantigen gebunden hat, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Der enzymgekoppelte Immunnachweis (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) ist eines dieser Verfahren. Der ELISA kann im Prinzip zur Bestimmung jedes Antigens, Haptens oder Antikörpers ausgearbeitet werden, seine Anwendung hat er heute vor allem in der klinischen Biochemie gefunden. Man mißt damit beispielsweise hämatologische Faktoren sowie die Konzentrationen von Serumproteinen wie z.B. Immunglobuline, onkofötale Proteine und Hormone wie z.B. Insulin. Bei der Diagnostik infektiöser Erkrankungen werden bakterielle Toxine, Mikroorganismen wie *Candida albicans*, *Rotaviren*, *Herpesviren*, *HIV* oder *Hepatitis-B*-Oberflächenantigen auf diese Weise nachgewiesen. Des Weiteren werden immunchemische Analyseverfahren zur Antikörperbestimmung, zwecks Diagnose abgelaufener oder ablaufender Infektionskrankheiten (z.B. mit HIV, Hepatitis), angewendet.

Ein ELISA-Protokoll besteht im allgemeinen aus folgenden Teilschritten.

1. Die Probe, die ein spezifisches Molekül oder einen bestimmten Organismus enthalten soll, wird an einen festen Träger gebunden (z.B. Mikrotiterplatte aus Kunststoff).
2. Der Nachweis eines Antigens (Protein, Peptid, Hapten-Konjugat, etc.) erfolgt durch die spezifische Bindung eines spezifischen Antikörpers (primärer Antikörper), der gegen das betreffende Antigen aus 1. gerichtet ist. Hierbei kann der primäre Antikörper selbst markiert sein (z.B. radioaktiv) und daher unmittelbar lokalisiert werden (z.B. Autoradiographie). Alternativ kann entsprechend dem folgenden Absatz weitergearbeitet werden.
3. Häufig erfolgt stattdessen die Zugabe eines zweiten Antikörpers (sekundärer Antikörper), der spezifisch an den primären Antikörper, aber nicht an das Antigen aus 1., bindet. Dieser zweite Antikörper ist häufig chemisch mit einem Enzym gekoppelt (Indikatorsystem), welches eine Umwandlung eines farblosen Substrates in ein farbiges Produkt katalysiert (z.B. Alkalische Phosphatase, Meerrettich-Peroxidase, etc.). Der zweite Antikörper ist meistens gegen den konstanten Abschnitt des ersten Antikörpers gerichtet. Nicht gebundene sekundäre Antikörper werden durch Waschen entfernt.
4. Zugabe eines farblosen Substrats und dessen Umwandlung in ein farbiges Produkt.

Erfolgt keine Bindung des primären Antikörpers an die in der Probe vorhandenen Antigene, so wird der primäre Antikörper im ersten Waschschritt entfernt. Folglich kann der enzymmarkierte sekundäre Antikörper ebenfalls nicht binden, d.h. der Testansatz bleibt farblos. Ist die betreffende antigene Struktur vorhanden, so kann der primäre Antikörper binden und an diesen der sekundäre Antikörper. Das an den zweiten Antikörper gekoppelte Enzym katalysiert die Farbreaktion, deren Produkt sich leicht nachweisen lässt (z.B. photometrisch, etc.). Die gemessene Menge der Enzymaktivität ist dem Gehalt an spezifischem Antigen bzw. Antikörper proportional (aus: Glick, B., Pasternak, J., Molekulare Biotechnologie, Spektrum Akademischer Verlag, 1995, S. 201 ff.).

Bei der Durchführung von Bindungstests bedarf es eines Indikatorsystems (z.B. Meerrettich-Peroxidase), welches eine Sichtbarmachung der abgelaufenen Immunreaktion erlaubt. Die Visualisierung beruht auf einer stabilen *Verknüpfung* zwischen dem untersuchten Reaktanten (Antigen oder Antikörper) und einem Indikatorsystem. Als Indikatoren (Amplifikatoren) werden eingesetzt: Fluoreszenzfarbstoffe, Lumineszenzfarbstoffe, Radioaktivität, Enzyme, etc.. Die Indikatoren können kovalent oder nicht-kovalent an die jeweiligen Reaktanten gebunden vorliegen. Als stabile *nicht-kovalente Verknüpfungen* zwischen Indikator und gesuchtem Reaktionspartner dienen z.B. die Antigen-Antikörper-Bindung, die Biotin-Avidin-Bindung oder die Lektin-Bindung.

Bei der direkten Methode ist der Primärantikörper mit dem Indikator kovalent verbunden. Die indirekte Anordnung umgeht die Markierung des Primärantikörpers. Der Primärantikörper wird durch einen Antikörper, der mit einem Indikator markiert ist, detektiert. Dieser Sekundärantikörper, der aus einer anderen Tierspezies gewonnen wird, bindet an alle Primärantikörper jeder beliebigen Spezifität aus der ersten Spezies.

Eine weitere Möglichkeit der Detektion stellt eine Methode dar, bei der drei Antikörper nacheinander zum Einsatz kommen. Der Primärantikörper aus Spezies A wird von einem nicht-markierten Sekundärantikörper aus Spezies B, der im Überschuß vorliegt detektiert. Anschließend folgt die Zugabe eines Tertiärantikörpers aus Spezies A, der mit einem Indikator verknüpft ist. Der Sekundärantikörper (Verbindungsantikörper) wirkt als Brücke zwischen Primär- und Tertiärantikörper. Durch die Verwendung mehrerer hintereinandergeschalteter Antikörper wird eine Steigerung der Empfindlichkeit vermittelt.

Die Sichtbarmachung des gebundenen Primärantikörpers kann alternativ durch andere Bindungssysteme erfolgen. Ein geeignetes System stellt die Avidin-Biotin-Complex-Bindung dar (ABC-System). Hierbei muß der Primär- oder der Sekundärantikörper biotinyliert vorliegen.

Die Indikatoren liegen ebenfalls biotinyliert vor und werden an das tetravalente Avidin unter Absättigung dreier Bindungsstellen gebunden. Die vierte Avidinbindungsstelle kann an den biotinylierten Primär- oder Sekundärantikörper binden. Sind die verwendeten Indikatoren mehrfach biotinyliert, ergeben sich sehr große Avidin-Enzym-Komplexe, die die Empfindlichkeit des Testsystems erhöhen (Anstelle von Avidin kann auch Streptavidin verwendet werden). (aus Bioanalytik, F. Lottspeich, H. Zorbas, Spektrum Akademischer Verlag, 1998, S. 91 ff) Bei diesem Verfahren besteht das Problem einer weiteren Steigerung der Empfindlichkeit.

Signalamplifikation durch den Einsatz einer derivatisierten, multimeren Lumazinsynthase in Lösung oder auf einer beliebigen Oberfläche:

1. *Durch Zwischenschaltung eines biotinylierten multimeren Lumazinsynthase-Konjugats (Linkerprotein) zwischen Primärantikörper und Indikator:* Eine Lumazinsynthase, die bis zu 60 Biotinmoleküle (z.B. über einen kurzen Abstandshalter an die Lumazinsynthase gebunden, um eine mögliche sterische Hinderung zu vermeiden) auf ihrer Oberfläche enthält, nimmt dabei aufgrund ihrer sphärischen, multimeren Struktur eine besondere Stellung ein. Die Bindung zwischen Antikörper und Linkerprotein bzw. zwischen Linkerprotein und Indikator erfolgt dabei unter Verwendung einer Avidinbrücke oder einer Streptavidinbrücke. Alternativ dazu, können auch Avidin- oder Streptavidin-markierte Primärantikörper bzw. Indikatoren zum Einsatz kommen. An 59 der 60 Biotinmoleküle auf dem multimeren Linkerprotein können Indikatormoleküle gebunden werden, wobei lediglich ein Biotinmolekül zur Vermittlung einer Bindung zwischen Primärantikörper und Linkerprotein notwendig ist. Durch die resultierende mehrfache Bindung von farbreaktionvermittelndem Enzym, wird eine extreme Signalverstärkung erreicht, wobei die Signalstärke proportional zur Antigenkonzentration ansteigt.

2. *Durch Einsatz von heterooligomeren biotinylierten Lumazinsynthase-Konjugaten:* Durch die erfindungsgemäße Reassoziation von unterschiedlichen Lumazinsynthase-Varianten (beispielsweise eine Kombination von 1-3 Antigen-enthaltenen Lumazinsynthasemonomeren mit bis zu 59 biotinylierten Lumazinsynthasemonomeren), wird ein heterooligomeres Lumazinsynthase-Konjugat erzeugt, welches sowohl einen Reaktanden (z.B. Antigen) als auch mehrere Biotin-Moleküle enthält. An die Biotin-Moleküle können Streptavidin- oder Avidin-vermittelt (oder auch über einen Anti-Biotin-Antikörper) Indikatormoleküle gebunden werden. Exemplarisch sollen im folgenden zwei Einsatzmöglichkeiten besprochen werden: A) Ein Lumazinsynthase-Konjugat, welches 1-5 kurze Peptide von antigen wirksamen viralen

oder bakteriellen Oberflächenproteinen (antigene Determinanten) und bis zu 60 Biotinmoleküle kovalent gebunden enthält, dient als Detektionsmolekül für immobilisierte Antikörper, die aus einem Patientenserum oder anderen Flüssigkeiten stammen. B) Charakteristische Antikörper gegen bestimmte Infektionskrankheiten werden mit Hilfe spezieller immobilisierter Epitope (Teile von Oberflächenproteinen der betreffenden pathogenen Organismen: antigene Determinanten) aus der jeweiligen Körperflüssigkeit gefischt. Ein Lumazinsynthase-Konjugat, welches ebenfalls 1-5 Kopien des oben bezeichneten Epitops und bis zu 60 Biotinmoleküle kovalent gebunden enthält, dient als Detektionsmolekül für die, an das immobilisierte Epitop gebundenen, Antikörper. Eine Farbreaktion wird in beiden Fällen (A und B) durch ein beliebiges streptavidingekoppeltes Enzym, welches einen Komplex mit der biotinylierten Lumazinsynthase eingeht, erreicht. Durch die Zwischenschaltung dieses mehrfach biotinylierten Linkerproteins (Lumazinsynthase-Konjugat) und der dadurch bedingten mehrfachen Bindung von farbreaktionvermittelndem Enzym, wird eine Signalverstärkung erreicht.

3. *Durch Einsatz von heterooligomeren, nicht biotinylierten, Lumazinsynthase-Konjugaten:* Durch die erfindungsgemäße Reassoziation von unterschiedlichen Lumazinsynthase-Varianten wird ein heterooligomeres Lumazinsynthase-Konjugat erzeugt, welches sowohl einen Reaktanden (z.B. Antigen, welches spezifisch Antikörper aus einem Patientenserum binden kann) in einfacher Ausführung, als auch Epitope in mehrfacher Ausführung, welche von Indikator-markierten Antikörpern erkannt werden, enthält. Auch hierbei wird, durch die mögliche mehrfache Bindung von Antikörper-Indikator-Komplexen an das multimere Protein, eine Signalverstärkung erreicht.

Biosensoren

Klassische biochemische Analysenverfahren, wie z.B. der Immunassay, basieren auf chemischen Reaktionssystemen in flüssigem Zustand. Eine mögliche Alternative bietet die Anwendung von Festphasenmeßapparaturen oder Biosensoren. In den letzten Jahren findet die Verwendung von Biosensoren als schnelle und empfindliche Testsysteme zum Nachweis verschiedenster Stoff- und Molekülklassen immer mehr Anwendung. Ein Biosensor besteht aus mindestens drei Bestandteilen: biologischer Rezeptor, Wandler und angegliederte Elektronik. In einem Immunsensor kann der biologische Rezeptor ein Antikörper oder ein Antigen sein, der auf verschiedene Arten an den Wandler gekoppelt ist. In beiden genannten

Variationen ermöglichen die Sensoren die Messung sich spezifisch ausbildender Antigen-Antikörper-Komplexe.

Für den Einsatz als chemische Sensoren in Flüssigkeiten, beispielsweise Seren, sind vor allem Volumenschwinger geeignet. Zu ihnen gehören die Schwingquarze, die auf einer speziell behandelten Oberfläche (je nach Testprinzip) mit antigenen Proteinen oder monoklonalen Antikörpern beschichtet werden. Legt man an diese Quarze eine elektrische Wechselspannung an, so wird der Kristall zu elastischen Schwingungen angeregt, deren Amplitude ein Maximum erreicht, wenn die elektrische Frequenz mit einer der mechanischen Eigenfrequenzen des jeweiligen Quarzes übereinstimmt. Diese Schwingungen lassen sich mit geeigneten Meßsystemen erfassen. Gibt man einen mit Antigenen beschichteten Quarzkristall in eine Lösung, die spezifisch bindende Antikörper enthält, so lagern sich diese an seine Oberfläche an und verändern seine Masse. Dadurch wird eine Veränderung seiner Schwingfrequenz erreicht und zeigt so die Bindung eines Antikörpers an. Neben diesen piezoelektrischen Immunsensoren versucht man, Meßtechniken zu entwickeln, deren Funktionsweise derjenigen von potentiometrischen Elektroden gleicht, die also Ähnlichkeit zu pH-Meßgeräten haben. In diesem Fall zielt man darauf ab, die Veränderung des Potentials zu bestimmen, die bei der Ausbildung der Antigen-Antikörper-Komplexe auf einer dünnen equilibrierten Silicagelschicht an der Oberfläche der pH-Glasmembran entsteht. Eine weitere Möglichkeit der immunsensorischen Messung besteht in der Immobilisierung von Proteinen (Antikörper oder Antigene) auf der Oberfläche einer optischen Faser. Die bei diesem Verfahren am häufigsten genutzten optischen Phänomene sind interferierende Wellen und Oberflächenplasmonen. Eine interferierende Welle wird gebildet, wenn Licht, das an einer optischen Faser entlang strahlt, intern reflektiert wird. Diese interferierende Welle ist die elektromagnetische Energie, die an der Schnittstelle von Faseroptik und Flüssigkeit entsteht. Die Energie wird absorbiert, wenn absorbierende Moleküle an der Schnittstelle auftreten, so daß der Grad der Absorption proportional zu der Menge des absorbierenden Materials der Schnittstelle ist. Die Ausbildung von Antigen-Antikörper-Komplexen, wobei das Antigen oder der Antikörper an die Faseroberfläche gebunden vorliegt, kann so nachgewiesen werden. Bei der 'Surface plasmon resonance' wird ein metallbeschichtetes Glas als optische Einrichtung benutzt, bei der ein intern vollständig reflektierter Lichtstrahl eine induzierte elektromagnetische Oberflächenwelle oder Plasmon hervorruft. Eine nachweisbare Oberflächenplasmonresonanz tritt bei einem bestimmten Einfallswinkel des Lichts auf, der entscheidend vom Refraktionsindex des Mediums, welches an den Metallfilm angrenzt.

abhängt. Somit können Veränderungen in dieser Schicht, wie sie z.B. nach der Ausbildung von Antigen-Antikörper-Komplexen zu erwarten sind, gemessen werden.

Zu den potentiometrischen Immunsensoren sind die ionensensitiven Feldeffekttransistoren zu zählen. Eine Rezeptor (Antikörper, Antigen oder sonstiger Rezeptor) wird dabei auf dem Halbleiterort des Transistors verankert. Die Bindung eines Analyten an die Rezeptorschicht ruft eine Veränderung in der Ladungsverteilung und damit eine Schaltung des Feldeffekttransistors hervor. (Aus Modrow S., Falke D., Molekulare Virologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, S. 108; Liddell E., Weeks I., Antikörper-Techniken, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, S. 154 ff). Auch bei diesen Sensorverfahren besteht der Wunsch nach Steigerung der Empfindlichkeit.

Signalamplifikation durch den Einsatz derivatisierter, multimerer Lumazinsynthasemoleküle auf einer signalvermittelnden Oberfläche:

Artefizielle Proteinmoleküle auf der Grundlage der Lumazinsynthase können beim Aufbau eines Biosensors als Trägerprotein z.B. zur Präsentation von antigen wirksamen Fängerpeptiden, zum Nachweis von Antikörpern gegen bestimmte Infektionen dienen. Durch die erfindungsgemäße Ausbildung von gemischten Lumazinsynthase-Konjugaten können die jeweiligen Peptide zusammen mit einem bindungsvermittelnden Biotinmolekül in eine ikosaedrische Struktur eingebaut werden. Auf diese Weise können bis zu 59 identische oder verschiedene antigen wirksame Peptide (z.B. Domänen von viralen Oberflächenproteinen) in Verbindung mit einem Biotinmolekül, auf einem ikosaedrischen Molekül präsentiert werden. Durch Verwendung mehrerer verschiedener multimerer Lumazinsynthase-Konjugate lässt sich eine repräsentative Peptidbibliothek auf einem einzigen Sensor plazieren. Die Bindung der multimeren Lumazinsynthase-Konjugate an die Oberfläche eines Wandlers lässt sich beispielsweise über eine Streptavidin/Biotin-Kopplung ermöglichen.

Die Empfindlichkeit eines derartigen Testsystems wird durch das Anbieten mehrerer antigener Determinanten erheblich gesteigert, da dadurch nicht nur ein, sondern mehrere gegen einen bestimmten Erreger gebildeter Antikörper erfasst werden. Des Weiteren ist kein fundiertes Detailwissen über Proteinabschnitte erforderlich, die zur Bindung von Antikörpern beitragen, da mit begrenztem Aufwand mehrere Proteine des betreffenden Erregers auf dem Sensor präsentiert werden können. Da die Streptavidin/Biotin-Kopplung für alle Epitoppräsentationen verwendet werden kann, benötigt man zum Aufbau eines Biosensors immer die gleichen, nämlich Avidin oder Streptavidin beschichtete Oberflächen, d.h. die instrumentelle

Ausstattung muß nicht verändert werden. Die jeweiligen individuellen, epitoppräsentierenden oder biotinylierten Lumazinsynthase-Untereinheiten können leicht auf rekombinantern Wege hergestellt werden. Dies hat wesentliche Vorteile bei der Entwicklung bzw. der Evaluierung derartiger Nachweisverfahren.

Durch die Anwesenheit von bis zu 59 Fängerpeptiden in einem Molekül kann die Oberfläche eines Sensor-Chips (z.B. Feldeffekttransistor, Oberflächenplasmon-Wandleroberfläche, etc.) extrem vergrößert werden und dadurch eine enorme Empfindlichkeitssteigerung erreicht werden. Stabilitätsprobleme und Unspezifitäten sind bei der Verwendung eines thermostabilen Trägerproteins und des Biotin/Streptavidin-Systems nicht zu erwarten.

Ebenso können auch kleine Moleküle durch einfache chemische Kopplung an die Oberfläche gebunden werden. Als Kopplungsorte stehen hierfür singuläre, exponierte reaktive Aminosäuren auf der Oberfläche des sphärischen Proteins zur Verfügung.

Prinzipieller Aufbau eines Schichtsystems auf der Basis einer multimeren Lumazinsynthase: Eine funktionalisierte Lumazinsynthase ist mit 60 gleichen bzw. unterschiedlich modifizierten Untereinheiten über einen Anker (Peptid, Fettsäure, etc.) mit einer Oberfläche (beispielsweise Wandleroberfläche oder sonstige beliebige Oberfläche, die sich schon auf einem Wandler befindet) verbunden. Die Detektionsempfindlichkeit für Fremdmolekülbindung auf der Oberfläche der Lumazinsynthase wird dabei durch eine hohe Anzahl funktioneller Gruppen (beispielsweise Epitope zur Antikörpererkennung, Antikörper zur Detektion von Fremdmolekülen in Lösung oder sonstiger Rezeptoren) erhöht.

Herstellung von Impfstoffen (in vitro)

Impfungen führen zu einer immunologischen Resistenz gegen Krankheitserreger. Impfstoffe dienen überwiegend zur Prävention, das heißt, sie sollen bei den immunisierten Personen einen Schutz aufbauen, der sie bei Kontakt mit dem jeweiligen Erreger vor der Infektion und somit vor der Erkrankung schützt. Der injizierte oder oral verabreichte Impfstoff führt im Organismus zur Bildung von Antikörpern und/oder zu einer zellulären Immunantwort. Infolgedessen wird bei einer künftigen Exposition der infektiöse Organismus abgetötet oder neutralisiert, so daß die Krankheit nicht ausbricht.

Infektionen mit Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen sind weltweit ein Hauptfaktor der Morbidität und Mortalität. Durch die zunehmende Resistenzentwicklung gegen so gut wie alle verfügbaren Antibiotika ist auch in Industrieländern eine Verschärfung der

Morbiditätssituation zu erwarten. Die Entwicklung neuartiger Impfstoffe ist auch deshalb von größter medizinischer Bedeutung.

Als Impfstoffe kommen unter anderem attenuierte Viren zur Anwendung. Attenuierte Viren ähneln den krankheitserzeugenden Erregern, sie unterscheiden sich von ihnen jedoch im Hinblick auf das Virulenzverhalten; sie verursachen nur eine begrenzte bzw. abgeschwächte Infektion und induzieren dadurch die Bildung von neutralisierenden Antikörpern und cytotoxischen T-Zellen. Die molekulare Basis der Attenuierung sind Mutationen im Genom von Wildtypviren. Attenuierte Viren verleihen meist einen sehr guten Impfschutz, der über mehrere Jahre erhalten bleibt, sie bergen jedoch das Risiko, daß sie im Verlauf der abgeschwächten Infektion zur Wildtypform zurückmutieren können.

Eine weitere Möglichkeit zur Immunisierung bei Mensch und Tier besteht in der Präsentation von antigen wirksamen Teilen von viralen Oberflächenproteinen auf anderen, nicht pathogen wirkenden Viren, z.B. Pflanzenviren. Die Genfragmente, die für eine antigene Determinante (z.B. Oberflächenprotein) des pathogen wirkende Virus kodieren werden in das Genom des nicht pathogen wirkenden Virus eingebaut (Dalsgaard et al., 1997). Das Fremdprotein wird zusammen mit einem viralen Protein auf der Oberfläche des nicht-pathogen wirkenden Virus präsentiert. Es können jedoch nicht beliebig große DNA-Fragmente in das Virusgenom integriert werden. Daher muß man genau wissen, welche Proteine des Virus, gegen dessen Infektion ein Impfschutz erzeugt werden soll, für die Auslösung einer schützenden Immunantwort wichtig sind. Ein derartiger Impfstoff kann nicht die Breite einer Immunantwort erzeugen, die beim Ablauf einer Infektion mit dem Wildtypvirus oder seiner attenuierten Variante entsteht. Bei dieser Art von rekombinanten Impfviren beschränkt sich die immunologische Reaktion auf ein ausgewähltes Protein.

Impfstoffe, die aus synthetischen Peptiden mit einer Länge von 15 bis 30 Aminosäuren bestehen, stellen eine Vakzineform dar, die sich heute in der Erprobung befindet. Hier werden einzelne Epitope viraler Proteine, welche die Bildung von neutralisierenden Antikörpern bewirken, ausgewählt und chemisch synthetisiert. Voraussetzung ist auch in diesem Fall ein fundiertes Detailwissen über die Proteinabschnitte, die eine virusneutralisierende Immunantwort hervorrufen können. Aufgrund der hohen genetischen Variabilität der meisten Viren und der unterschiedlichen Fähigkeit einzelner Individuen, bestimmte Proteinregionen immunologisch zu erkennen, müßten in einem auf synthetischen Peptiden basierenden Impfstoff mehrere verschiedene Epitope miteinander kombiniert werden. Da es abgesehen von Aluminiumhydroxid kein geeignetes beim Menschen einsetzbares Adjuvans, das die

Immunantwort in ausreichender Weise verstärken kann, gibt, ist bislang noch kein Impfstoff verfügbar, der auf synthetischen Peptiden beruht. (Aus Modrow S., Falke D., Molekulare Virologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, S. 87 ff)

Im Gegensatz zu kurzen Peptiden eignen sich hochmolekulare Moleküle, u.a. Proteine undträgerfixierte Peptide, da sie ohne die Verwendung von Hilfsstoffen verabreicht werden können, aber dennoch eine gute Immunität liefern, vorzüglich als Impfstoffe. Das redundante Vorkommen antigener Determinanten in hoher Anzahl, wie sie z.B. bei Viren oder Bakterien zu beobachten sind, auf dem immunogenen hochmolekularen Molekül begünstigt dabei die erwünschte hohe Antigenität d.h. die präventive Immunantwort. Als Trägerprotein eignet sich hierfür, insbesondere wegen ihrer ikosaedrischen Struktur, die Lumazinsynthase. Die Lumazinsynthase besteht aus mindestens 60 Untereinheiten, d.h. mindestens 60 gleichartige oder verschiedene antigene Determinanten lassen sich in einem Molekül präsentieren. Die Lumazinsynthase ist hochmolekular aufgebaut und hat eine mit einigen Viren vergleichbare Oberflächenstruktur, d.h. eine hohe Antigenität ist zu erwarten. Derartige Impfstoffe sind frei von viralen Genen und sie lassen sich mit relativ geringem Aufwand in hohen Mengen herstellen. Da große Teile der Virusproteine präsentiert werden können, ist in diesem Fall kein fundiertes Detailwissen über die Proteinabschnitte, die eine virusneutralisierende Immunantwort hervorrufen können, erforderlich.

Die gentechnisch hergestellten Proteine, welche Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, beruhen auf der kovalenten Verknüpfung einer Wildtyp-Lumazinsynthasesequenz oder einer modifizierten Lumazinsynthase mit Teilstrukturen von Viren, Bakterien, Pilzen, Protozoen oder Toxinen. Die Verknüpfung kann dabei am N-Terminus und/oder am C-Terminus der Lumazinsynthase erfolgen. Außerdem können die zu präsentierenden Peptide an geeigneten Stellen der Lumazinsynthaseuntereinheit so in die Sequenz eingefügt werden, daß sie in Form einer Schleife auf der Oberfläche des Multi-Untereinheiten-Proteins präsentiert werden. Damit kann eine gegebene immunologische Determinante in einer definierten hohen Anzahl, z.B. erfindungsgemäß bevorzugt 60-fach oder 120-fach, auf einem ikosaedrischen Molekül aus 60 Untereinheiten mit der Triangulationszahl $T = 1$, präsentiert werden. Außerdem können auch höhermolekulare Assoziate hergestellt werden, welche mehr als 100 Untereinheiten enthalten (Triangulationszahl $T = 2$ oder höher) und damit eine noch größere Anzahl Epitope präsentieren können.

Die erfindungsgemäße Assoziation von Untereinheiten mit unterschiedlichen, gentechnisch aufgepfropften Peptid- oder Proteinsequenzen bietet auch die Möglichkeit zur Herstellung von

Proteinmolekülen, welche mehrere unterschiedliche antigene Sequenzen auf **einem** gegebenen Molekül präsentieren können.

DNA-Impfstoff

Seit dem Beginn der 90er Jahre wird auch die Möglichkeit zum Einsatz von DNA als Impfstoff untersucht. Die verwendeten Nukleinsäuren enthalten Gene oder Teile von Genen eines pathogenen Organismus, die ein immunogenes Protein spezifizieren. Für die Entwicklung dieser Vakzine ist detailliertes Wissen über die immunologisch wichtigen Komponenten von großem Nutzen. Die verwendeten Gene kodieren überwiegend für die Oberflächenkomponenten eines Erregers oder auch für Teile von bakteriellen Toxinen. Sie werden zusammen mit regulatorischen Elementen zur Kontrolle ihrer Expression in ein Vektorsystem integriert und als gereinigte DNA intramuskulär injiziert und dort exprimiert. Insbesondere in Muskelzellen ist die DNA über lange Zeiträume als Episom nachweisbar, da sie offensichtlich nur sehr langsam abgebaut wird. Wenn die entsprechenden Gene exprimiert werden, kann der Organismus sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort entwickeln. Diese Form der Impfstoffe wurde bisher im Tiersystem erprobt.

Genkonstrukte, welche Fusionsproteine bestehend aus Proteinkomponenten pathogener Mikroorganismen und aus Lumazinsynthase spezifizieren, sind grundsätzlich als DNA-Impfstoff geeignet. Ein DNA-Vakzin, bestehend aus einem Gen kodierend für eine Lumazinsynthase (partikelbildende Komponente) und einem ausgewählten Gen des Erregers kann intrazellulär exprimiert werden und kann so eine relativ lang anhaltende Produktion des Immunsystems stimulierenden Antigens gewährleisten. Nach den bisherigen Erfahrungen mit Lumazinsynthase aus verschiedenen Organismen sollte der Zusammenbau des Ikosaeders *in vivo* ohne Hilfsmoleküle (vgl. Chaperonine) möglich sein.

Orale Impfstoffe auf pflanzlicher Basis

Ist bekannt, gegen welche immunologisch wichtige Proteinkomponente des Erregers eine schützende Immunantwort induziert wird, kann das für dieses Peptid kodierende Gen in einen eukaryotischen Expressionsvektor eingebracht werden. Nach Transformation von Pflanzenzellen mit dieser DNA können transgene Pflanzen erhalten werden, welche das betreffende Gen exprimieren. Durch Verzehr von Teilen dieser transgenen Pflanze wird auch die ausgewählte Proteinkomponente in den Körper aufgenommen und kann dort eine Immunantwort induzieren.

Als partikelbildendes Protein eignet sich insbesondere die Lumazinsynthase, an die Teile von immunologisch wirksamen Proteinen des Erregers fusioniert sind. Durch Verwendung einer

thermostabilen, partikelbildenden Lumazinsynthase (z.B. aus *Aquifex aeolicus*) als Trägerprotein kann sogar ein kochfester Impfstoff erzeugt werden.

Multifunktional derivatisierte Immuntherapeutika auf der Basis der multimeren Lumazinsynthase

Impfstoffe sollen die Vermehrung eines Krankheitserregers und damit eine Infektion verhindern. In einigen Fällen ist es schwierig, einen zuverlässigen Impfstoff zu entwickeln, da der pathogene Organismus für Antikörper nicht zugänglich ist, oder wie im Fall der erworbenen Immunschwäche (AIDS) zu wenig über den Erreger (HIV) bekannt ist. Die Zielzellen von HIV sind Helfer-T-Lymphozyten (Helferzellen) des Immunsystems, wobei die wichtigsten Funktionen dieser Zellen gestört werden. Wenn HIV in eine Helferzelle eindringt, ist das Virus vor dem immunologischen Angriff geschützt. Im weiteren Verlauf der Krankheit kann die infizierte Zelle durch die Produktion und die Freisetzung von HIV-Partikeln zerstört werden. Eine infizierte Zelle kann dabei zu einer „Fabrik“ für die Produktion weiterer Viruspartikel werden. Die Konsequenz einer HIV-Infektion ist vor allem, daß das Immunsystem keinen Schutz mehr vor gewöhnlichen Infektionskrankheiten bieten kann. Der erste Schritt bei einer HIV-Infektion ist die Wechselwirkung eines 120 kDalton-Glykoproteins (gp120) aus der Virushülle und dem CD4-Rezeptor an der Oberfläche der Helferzellen. Antikörper gegen CD4 blockieren *in vitro* die HIV-Infektion von Helferzellen. Auch bei einem Überschuß an freiem CD4-Protein geht die Infektionsrate *in vitro* zurück. Die Entwicklung eines Fusionsproteins aus einem Teil des CD4-Proteins und aus dem Fc-Anteil eines Immunglobulins stellt den Versuch dar, sowohl den Schutz der Helferzellen als auch die Abtötung des Virus zu erreichen. Das Fusionsprotein wird CD4-Immunadhäsin genannt. Das Molekül bindet an gp120 und blockiert das HIV; beides sind Funktionen des CD4-Anteils. Die Fähigkeit des Fusionsproteins, an Zellen mit Fc-Rezeptoren zu binden, und die lange Halbwertszeit im Plasma sind hingegen auf den Immunglobulinanteil zurückzuführen. Nach der Bindung des Immunadhäsins an das freie Virus oder an HIV-infizierte Zellen kommt es zu einer antikörperabhängigen, zellvermittelnden cytotoxischen Reaktion, die zur Zerstörung des Virus oder der HIV-infizierten Zelle führt. (aus: Glick, B., Pasternak, J., Molekulare Biotechnologie, Spektrum Akademischer Verlag, 1995, S. 245).

Durch die Verwendung einer multimeren derivatisierten Lumazinsynthase könnte sich die Effizienz dieser Strategie verbessern lassen. Es kann eine funktionalisierte Lumazinsynthase zur Verwendung kommen, die sowohl über CD4-Protein-Anteile, als auch über Fc-Anteile

verfügt. Da pro Molekül nicht nur eine funktionelle Einheit, sondern viele dieser Einheiten, vorhanden sind, sollte sich die Effizienz erheblich steigern lassen.

Anstelle des CD4-Anteils könnte man in das multimere Protein auch Antikörper (z.B. speziell entwickelte „Single-chain-Antikörper“), die beispielsweise spezifisch gegen einen Tumormarker (z.B. gegen das Teratocarcinom-Antigen) gerichtet sind, einführen und dieses funktionalisierte Fusionsprotein zur Krebstherapie einsetzen.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ist die Kombination eines Antikörpers gegen einen Tumormarker mit Metallothionein. Die multimere Lumazinsynthase ist dabei mit einem Anti-Tumor-Antikörper und bis zu 59 Metallothionein-Molekülen dekoriert. Die Metallothioneinmoleküle wiederum werden mit radioaktiven Elementen (mit relativ kurzer Halbwertszeit), welche für eine Strahlentherapie geeignet sind (beispielweise Technetium 99) beladen. Im Laufe der Therapie bindet der Proteinkomplex über seinen Antikörper-Anteil an den Tumor und führt dabei die Strahlenquelle direkt an das Tumorgewebe heran. Ähnliche Konstrukte können auch für diagnostische Zwecke, z.B. zur radioaktiven Detektion einer möglichen Krebserkrankung, eingesetzt werden.

Verwendung von Lumazinsynthase-Konjugaten bei der Charakterisierung und Reinigung von Antikörpern

Die Grundlage der Fremdpeptide bilden DNA-Sequenzen, die für ein bestimmtes Epitop (antigene Determinante) kodieren. Die Sequenz der zusätzlichen Peptidsegmente kann durch entsprechende Wahl der DNA-Sequenz exakt bestimmt werden. Es können aber auch Peptidsequenzen eingebaut werden, die in ihrer gesamten Länge oder in Teilabschnitten eine stochastische Aminosäuresequenz besitzen. Eine vielfältige, zufallsorientierte Variabilität dieser Peptide kann durch den Einsatz von synthetischen Oligonukleotiden, die über einen zufällig (randomisiert) generierten Sequenzabschnitt verfügen, erreicht werden, so daß repräsentative Peptidbibliotheken entstehen. Diese zufällige generierten Peptide werden erfindungsgemäß auf der Oberfläche der Lumazinsynthase präsentiert und sind somit auch für eine Antikörperbindung zugänglich.

Die erhaltenen Lumazinsynthase-Varianten (mit einer zufallsorientierten Variabilität des Fremdpeptids) können z.B. zur Charakterisierung von Antikörper-Bindungsstellen verwendet werden. Durch die Isolierung von Antigen-Antikörper-Komplexen mit anschließender Sequenzierung des gebundenen Peptidanteils (N-terminale Edman-Sequenzierung oder

Sequenzbestimmung mittels Massenspektroskopie), kann die Selektivität der Bindungsstelle eines Antikörpers charakterisiert werden.

Des Weiteren kann gezielt nach Antikörpern, die über eine bestimmte Antigenerkennung (Antigensequenz in diesem Fall bekannt) verfügen, gesucht werden. Durch den Einsatz von Misch-Konjugaten, d.h. Lumazinsynthase-Konjugaten, die sowohl über ein gewünschtes Fremdpeptid (in mehrfacher Ausführung), als auch über einen biotinylierten Anteil (in einfacher Ausführung) verfügen, können selektiv Antikörper aus einer Mischpopulation gereinigt werden. Die Verwendung von Streptavidin oder Avidin gekoppelt an eine feste Phase bietet sich hierfür an. Die Reinigung kann erfindungsgemäß aber auch auf der Basis von anderen Affinitätsmaterialien erfolgen. Die Elution der Antikörper erfolgt durch bekannte Standardmethoden.

Lösung der beschriebenen technischen Probleme

Die Lösung der oben beschriebenen technischen Probleme wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen erzielt. Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Lumazinsynthase-Molekülen als Trägerprotein für Fremdproteine, Peptide und/oder sonstige organisch-chemische Moleküle. Ferner ist Gegenstand dieser Erfindung ein Verfahren zum selektiven, rekombinanten Einbau der obengenannten Fremdproteine, bzw. Peptide sowohl in Schleifen (loops) oder erfindungsgemäß vorzugsweise am N-Terminus und/oder am C-Terminus von Lumazinsynthasen. Das Verfahren beinhaltet eine *in vivo* Assoziation von unterschiedlichen Lumazinsynthase-Konjugaten auf dem Wege einer Koexpression der betreffenden Gene in einer Zelle. Ferner beinhaltet das Verfahren die Möglichkeit der *in vitro* Reassoziation von individuell gestalteten Lumazinsynthase-Konjugaten zu sphärischen Partikeln auf dem Wege der Denaturierung/Renaturierung von monomeren Untereinheiten, die sowohl mit als auch ohne die Verwendung eines faltungsunterstützenden Liganden durchgeführt werden kann.

Bereitgestellt werden Lumazinsynthase-Konjugate, die über ein biotinylierfähiges Peptid (Tucker und Grisshammer, 1996; Schatz, 1993; Cronan, 1990) am C-Terminus verfügen.

Des Weiteren wird ein artfizielles Lumazinsynthase-Molekül bereitgestellt, welches an seinem C-Terminus über eine gut zugängliche basische Aminosäure (Lysin) verfügt. Ferner wird ein Lumazinsynthase-Molekül bereitgestellt, welches über ein, gut zugängliches Cysteinmolekül am C-Terminus verfügt. Beide Varianten eignen sich zur chemischen Kopplung von

organischen Molekülen. Die Kopplung kann z.B. erfolgen durch Herstellung einer Säureamidbindung oder einer Disulfidbindung zwischen Protein und Kopplungskomponente. Die chemische Kopplung nach dem Amidprinzip kann auch erfolgen an Lysinreste, die natürlicherweise auf der Oberfläche von Lumazinsynthasemolekülen vorkommen.

Des Weiteren wird eine thermostabile ikosaedrische Lumazinsynthase (aus *Aquifex aeolicus*) bereitgestellt, die sich unter anderem als Trägerprotein zur Herstellung von besonders stabilen Lumazinsynthase-Konjugaten eignet.

Das Verfahren zur Herstellung von Lumazinsynthase-Konjugaten beinhaltet folgende Teilschritte:

I. Präparation des Fusions-Vektors

- A) Gewinnung einer DNA, die ein Gen für eine Lumazinsynthase enthält (z.B. durch Isolierung aus einem Organismus, durch PCR-Amplifikation mit natürlich vorkommender RNA oder DNA als Matrix, oder durch DNA-Synthese)
- B) Einführung von geeigneten Restriktionsschnittstellen zur späteren Insertion von Fremd-DNA in das Lumazinsynthasegen; Anpassung der Lumazinsynthasesequenz an besondere Anforderungen mit Hilfe bekannter molekularbiologischer oder biochemischer Mutagenesemethoden; Insertion der DNA in einen Klonierungsvektor unter Verwendung bekannter molekularbiologischer Methoden. (Alternativ hierzu kann der für das Fremdpeptid kodierende DNA-Abschnitt direkt unter Verwendung der Polymerasenkettreaktion und synthetischer Oligonukleotide mit dem Lumazinsynthasegen fusioniert werden, wobei II.D gewährleistet sein muß)
- C) Transformation von Wirtszellen mit dem entstandenen Plasmid
- D) Selektion der Transformanden mit Hilfe von Antibiotika oder anderen Selektionsverfahren
- E) Analyse der Transformanden mit Hilfe molekularbiologischer und biochemischer Verfahren, wie z.B. Restriktionskartierung, Sequenzierung, Messung einer enzymatischen Aktivität, etc.

II. Insertion einer für ein Fremdpeptid kodierenden DNA

- A) Klonierung der Fremd-DNA mit Hilfe molekularbiologischer Methoden oder synthetische Herstellung einer DNA unter Verwendung chemischer Verfahren
- B) Analyse der DNA unter Verwendung molekularbiologischer Verfahren

- C) Präparation der für das fusionierende Fremdpeptid-kodierenden DNA
- D) Insertion der präparierten DNA an das 5'- und/oder an das 3'-Ende und/oder in eine Schleifenregion des Lumazinsynthasegens im unter I. präparierten Vektor, so daß eine Fusion des Fremdgens mit dem Lumazinsynthasegen stattfindet. Die Klonierung hat so zu erfolgen, daß alle verwendeten Leserahmen im korrekten Leseraster eingebaut sind, damit die fusionierten Gen-Fragmente gemeinsam als Fusionsprotein translatiert werden.
- E) Transformation von Wirtszellen mit dem entstandenen Plasmid
- F) Selektion der Transformanden mit Hilfe von Antibiotika oder anderen Selektionsverfahren
- G) Analyse der Transformanden mit Hilfe molekularbiologischer und biochemischer Verfahren, wie z.B. Restriktionskartierung, Sequenzierung, Messung der enzymatischen Aktivität, etc.

III. Expression und Reinigung der hybriden Polypeptide

- A) Fermentation des Wirtsstammes mit der fusionierten artifiziellen DNA unter Verwendung bekannter mikrobiologischer Methoden.
- B) Expression der fusionierten artifiziellen DNA in den transformierten Wirtszellen als chimäres Protein. Die Expression der artifiziellen DNA kann eine beabsichtigte post-translationale Veränderung des chimären Proteins *in vivo*, z.B. Phosphorylierung, Glycosylierung, Biotinylierung, etc. einschließen.
- C) Präparation eines Zellextraktes mit dem fusionierten Polypeptid
- D) Reinigung des Fusionsproteins mittels chromatographischer oder sonstiger Methoden
- E) Falls erforderlich: Solubilisierung und *in vitro* Faltung (Renaturierung)
- F) Falls erforderlich: Chemische Modifizierung der Oberfläche von Lumazinsynthase-Varianten
- G) Falls erforderlich: *In vitro* Assoziation unter Kombination unterschiedlicher Lumazinsynthase-Varianten

Weitere Erläuterung des Verfahrens:

Bei Verwendung der vorliegenden Erfindung können eine Vielzahl verschiedener Vektoren zur Anwendung kommen. Extrachromosomal (episomale) Vektoren (z.B. Plasmide), Integrationsvektoren (z.B. Lambda-Vektoren), *Agrobakterium tumefaciens*-basierte Vektoren

für Pflanzen (z.B. Ti-Plasmid). Erfindungsgemäß bevorzugt sind Plasmidvektoren. Verwendete Plasmide können aus natürlichen Quellen isoliert oder synthetisch hergestellt worden sein. Das ausgewählte Plasmid sollte mit dem betreffenden Wirtsstamm kompatibel sein. Dazu sollte es u.a. über einen geeigneten, zum Wirtsstamm passenden Replikationsursprung verfügen. Ferner sollte die Kapazität des Vektors sowohl für die verwendete Lumazinsynthase-Variante als auch für das fusionierte Fremdpeptid ausreichend sein. Des Weiteren sind auf dem Plasmidvektor singuläre Schnittstellen zur Klonierung von DNA-Fragmenten erforderlich. Der Plasmidvektor sollte über geeignete Selektionsmechanismen, wie z.B. über ein Resistenzgen verfügen. Die Selektion ist notwendig, um Wirtszellen mit oder ohne Plasmid unterscheiden zu können.

Falls *Escherichia coli* als Wirtstamm ausgewählt wird, so sind erfindungsgemäß Vektoren, die über eine Promotorsequenz aus dem Bakteriophagen T5 oder T7, über eine Operatorsequenz, bevorzugt die Operatorsequenz aus dem *Escherichia coli* Lactose-Operon (*lacI*), über eine Klonierungskassette mit mehreren singulären Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen und eine effiziente Terminationssequenz verfügen, bevorzugt. Ferner sollte der Vektor über einen Replikationsursprung verfügen, der eine hohe Kopienzahl der extrachromosomal DNA in der Wirtszelle erlaubt.

Prokaryotische Expressionssysteme sind im allgemeinen gut geeignet zur rekombinanten Herstellung von erfindungsgemäßen Proteinkonjugaten. In einigen Fällen können jedoch posttranskriptionale Veränderungen notwendig sein, die in prokaryonten Organismen nicht eingeführt werden können. Eukaryote Proteine können beispielsweise in Prokaryoten nicht glykosyliert oder phosphoryliert werden. Vorzugsweise werden daher eukaryote Fremdproteine (fusioniert an die Lumazinsynthase), welche eine derartige posttranskriptionale Modifikation benötigen, unter der Kontrolle eines starken Promotors (z.B. AOX1) in niedrigen Eukaryoten (z.B. *Pichia pastoris*) oder unter der Kontrolle eines für Säugerzellen spezifischen Promotors (z.B. Ratten-Preproinsulin-Genpromotor) in Säugetierzellen (z.B. COS7-Affen-Nieren-Zellen) oder eines für Insektenzellen (z.B. *Baculovirus*, *Autographa californica*) spezifischen Promotors (z.B. Polyhedrinpromotor) exprimiert. Die verwendeten Vektoren sollten zu diesen genannten Wirtsstämmen kompatibel sein.

Zur Herstellung von oralen Impfstoffen auf pflanzlicher Basis bieten sich z.B. Vektorsysteme auf der Basis des Ti-Plasmids von *Agrobacterium tumefaciens* an. Als Alternative zur Genübertragung bei Pflanzen (z.B. bei monokotylen Pflanzen, wie Reis, Weizen, Mais, etc.) eignen sich physikalische Methoden (z.B. Beschuß mit Mikroprojektilen (Biolistik)).

Es können sowohl natürlich vorkommende Proteine als auch synthetische Proteine, die in der Natur nicht vorkommen, an das Trägerprotein (Lumazinsynthase) fusioniert werden. Als DNA-Quellen kommen z.B. Viren, prokaryote (Eubakterien, Archaea) und eukaryote Organismen (Pflanzen, Tiere) in Frage. Die zu fusionierende DNA kann auch synthetisch, unter Verwendung hierfür üblicher Methoden, hergestellt werden. Ferner kann die DNA auch mit Hilfe von Reverser Transkriptase aus mRNA hergestellt werden.

Die rekombinant erzeugten Plasmid-Vektoren werden zur Transformation von Wirtszellen verwendet. Erfundungsgemäß bevorzugt sind gut charakterisierte Bakterienzellen. Die Wirtszellen können auch eukaryote Zellen sein. Verwendete Wirtsstämme sollten über die zur Expression des fusionierten Polypeptides notwendige enzymatische Ausstattung verfügen. Transformationstechniken sind dem Fachmann bekannt. Protokolle hierfür sind bei Maniatis et al. (1982) beschrieben. Nach der Transformation erfolgt eine Analyse der Transformanden. Die Plasmide werden isoliert und mit Hilfe molekularbiologischer Methoden, wie Restriktionsanalyse, DNA-Sequenzierung, charakterisiert.

Die Expression einer klonierten DNA-Sequenz in einer prokaryoten oder eukaryoten Wirtszelle ist aus dem Stand der Technik bekannt. Die Kultivierung der transformierten Wirtszelle bei dem erfundungsgemäßen Verfahren zur Gewinnung von rekombinanten Fusionsproteinen findet unter solchen Bedingungen statt, die für die Expression der DNA-Sequenz förderlich sind. Der Zellaufschluß nach der Expression kann durch alle hierfür üblichen Methoden ausgeführt werden. Die aufgeschlossenen Zellen werden unter Verwendung bekannter Trennverfahren in eine lösliche und eine unlösliche Fraktion getrennt.

Sollte sich das Fusionsprotein in Form von Einschlußkörpern in der unlöslichen Fraktion befinden, so wird der nach einer Zentrifugation verbliebene Zellrückstand gewaschen und anschließend durch Zugabe eines Solubilisierungsmittels, gelöst. Die Solubilisierung erfolgt bevorzugt in Gegenwart von reduzierenden Agenzien. Die unlöslichen Stoffe werden mittels bekannter Methoden abgetrennt. Das erfundungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß der Renaturierungsschritt in Gegenwart eines Stabilisierungsmittels (5-Nitro-6-(D-ribitylamino)2,4(1H,3H)-pyrimidindion) durchgeführt werden kann.

Die Reinigung der Fusionsproteine kann mit Hilfe bekannter chromatographischer oder anderer biochemischer Methoden erfolgen.

Durch die molekularbiologische Einführung einer reaktiven Aminosäure, erfindungsgemäß bevorzugt eines Lysin- und/oder eines Cysteinrestes, gekoppelt an einen flexiblen Peptidlinker, wird eine kovalente Ankopplung von Molekülen auf chemischen Wege ermöglicht bzw. erleichtert. Die Kopplung kann erfindungsgemäß auf verschiedene Arten erfolgen. Als Beispiele sollen hier genannt werden: a) Bisimid-Ester sind in Wasser gut löslich und können unter milden Reaktionsbedingungen (pH 7,0 - pH 10,0) mit der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes reagieren. Die resultierende Amidbindung ist stabil. Auf diese Weise aktivierte Lumazinsynthasen können zur Kopplung mit anderen Peptiden verwendet werden. b) Carbodiimide gehören zu einer Verbindungsgruppe, die mit der allgemeinen Formel $R-N=C=N-R'$ zu beschreiben sind. R und R' können durch aliphatische oder aromatische Reste repräsentiert werden. Carbodiimide reagieren bevorzugt mit der ϵ -Aminogruppe von Lysin. c) m-Maleimido-benzoyl-N-hydroxysuccinimidester (MBS) ist ein gut untersuchtes heterobifunktionelles Reagenz. In neutraler wässriger Lösung reagiert MBS zunächst in einer Acylierungsreaktion mit Aminogruppen zum aktivierte N-hydroxysuccinimidester. Ein zweites Peptid kann dann mittels Addition eines Thiolrestes an die Doppelbindung des Esters gebunden werden. d) N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat (SPDP) ist ein heterobifunktionelles Reagenz, welches unter milden Bedingungen mit Aminogruppen des Zielproteins reagieren kann. Die 2-Pyridyldisulfid-Struktur kann dann mit aliphatischen Thiolen oder einem Cystein eines weiteren Peptids über eine Thiol-Disulfidaustauschreaktion reagieren. Die Kopplungsreaktion kann im pH-Bereich von 5-9 erfolgen und der Reaktionsfortschritt kann photometrisch verfolgt werden. Es sind keine Reaktionen mit anderen funktionellen Gruppen bekannt.

Die erfindungsgemäße Herstellung von *in vitro* reassozierten Lumazinsynthase-Konjugaten erfolgt über einen Dissoziationsschritt und einen nachfolgenden Faltungs/Reassoziationsschritt. Die Dissoziation kann erfolgen durch Behandlung mit denaturierenden Agentien, z.B. Harnstoff oder Guanidinchlorid, durch Änderung des pH-Werts, durch Wärmebehandlung oder andere Verfahren. Die nach der Denaturierung monomer vorliegenden chimären Proteine setzen sich jeweils aus einer konstanten Region, einer Lumazinsynthase (bzw. einer modifizierten Lumazinsynthase) und einer variablen

Region (ein beliebiges fusioniertes Peptid) zusammen. Die monomeren Untereinheiten können anschließend beliebig gemischt werden. Da die rekombinierten Untereinheiten jeweils einen konstanten Lumazinsynthaseanteil besitzen, ist eine Renaturierung der Lumazinsynthase Kernstruktur unter Ausbildung der natürlichen ikosaedrischen Struktur möglich. Die Renaturierung kann dabei in Gegenwart eines Stabilisierungsmittels (bevorzugt 5-Nitro-6-(D-ribitylamino)2,4(1H,3H)-pyrimidindion) erfolgen.

Die *in vivo* Kombination von verschiedenen Lumazinsynthase-Varianten erfolgt auf dem Wege der Coexpression der jeweiligen Gene, die für das gewünschte Fusionspolypeptid kodieren. Die betreffenden Gene können sich hierbei auf der chromosomal DNA des Wirtsstammes und/oder auf einem oder mehreren Plasmidvektoren befinden. Durch eine Abstimmung der Expression der *in vivo* zu assoziierenden Lumazinsynthase-Varianten lässt sich ein bestimmtes Mischungsverhältnis, d.h. bestimmte Kombinations-Varianten einstellen.

In den Zeichnungen bedeuten:

Figur 1 eine schematische Darstellung eines ELISA-Protokolls zum Nachweis eines bestimmten Antigens oder eines bestimmten Antikörpers. Das Antigen ist an die Mikrotiterplatte gebunden. Das Enzym (E) ist an den sekundären Antikörper gekoppelt. Das farblose Substrat wird durch das Enzym (E) zu einem farbigen Produkt umgesetzt.

Figur 2 beschreibt die Detektion eines Antigens mittels eines biotinmarkierten primären Antikörpers. Ein Lumazinsynthase-Konjugat (verstärkendes Linkermolekül), welches bis zu 60 Biotinmoleküle kovalent gebunden enthält ist über eine Streptavidin- oder eine Avidinbrücke (SA) an den biotinylierten primären Antikörper gebunden. Die Farbreaktion wird durch ein beliebiges streptavidingekoppeltes Enzym (E), welches einen Komplex mit der biotinylierten Lumazinsynthase eingeht, erreicht. Durch die Zwischenschaltung eines 60-fach biotinylierten Linkerproteins (Lumazinsynthase-Konjugat) und der dadurch bedingten mehrfachen Bindung von farbreaktionvermittelndem Enzym, wird eine extreme Signalverstärkung erreicht, wobei die Signalstärke proportional zur Antigenkonzentration ist.

Figur 3 beschreibt den Einsatz eines Lumazinsynthase-Mischkonjugates bei der Diagnostik von Infektionskrankheiten.

A) Ein Lumazinsynthasemolekül, welches 1-5 kurze Peptide von antigen wirksamen viralen oder bakteriellen Oberflächenproteinen (antigene Determinanten) und bis zu 60

Biotinmoleküle kovalent gebunden enthält, dient als Detektionsmolekül für immobilisierte Antikörper, die aus einem Patientenserum oder anderen Flüssigkeiten stammen.

B) Charakteristische Antikörper gegen bestimmte Infektionskrankheiten werden mit Hilfe spezieller immobilisierter Epitope (Teile von Oberflächenproteinen der betreffenden pathogenen Organismen; antigene Determinanten) aus der jeweiligen Körperflüssigkeit gefischt. Ein Lumazinsynthasemolekül, welches ebenfalls 1-5 Kopien des oben bezeichneten Epitops und bis zu 60 Biotinmoleküle kovalent gebunden enthält, dient als Detektionsmolekül für diese nun immobilisierten Antikörper.

Eine Farbreaktion wird in beiden Fällen durch ein beliebiges streptavidingekoppeltes Enzym (E), welches einen Komplex mit der biotinylierten Lumazinsynthase eingeht, erreicht. Durch die Zwischenschaltung eines mehrfach biotinylierten Linkerproteins (Lumazinsynthase-Konjugat) und der dadurch bedingten mehrfachen Bindung von farbreaktionvermittelndem Enzym, wird eine Signalverstärkung erreicht.

Nicht gebundene Antikörper werden in einem ersten Waschschritt entfernt. Erfolgt keine Bindung an die immobilisierten Epitope, so wird der Komplex aus Lumazinsynthase-Konjugat und Antikörper nicht gebildet. Überschüssiges Lumazinsynthase-Konjugat wird in einem zweiten Waschschritt entfernt, so daß der Testansatz farblos bleibt.

Figur 4 beschreibt eine schematische Darstellung einer Versuchsanordnung zur Reinigung von Antikörpern mit einer spezifischen Antigenerkennung. Ein Lumazinsynthase-Konjugat, das sowohl über ein gewünschtes Fremdpeptid (in mehrfacher Ausführung), als auch über einen biotinylierten Anteil (in einfacher Ausführung) verfügt, wird an über seinen Biotinanteil an immobilisiertes Streptavidin gebunden. Die Streptavidinmoleküle sind an eine feste Phase gekoppelt. Die Antikörpermischpopulation wird auf eine Säule mit immobilisiertem Streptavidin gegeben (oder mit Streptavidinmaterial gemischt), wobei die Antikörper mit der gewünschten Spezifität an den Fremdpeptidanteil auf dem Lumazinsynthase-Konjugat binden. Der Waschprozeß des Streptavidin-Lumazinsynthase-Konjugat-Antikörper-Komplex und die anschließende Elution der spezifischen Antikörper erfolgt durch bekannte Standardmethoden.

Figur 5 zeigt eine schematische Darstellung des Aufbaus eines Biosensors, der prinzipiell aus mindestens drei Teilen bestehen kann: 1. Der biologische Rezeptor, 2. Die Wandler-Einheit, 3. Die angegliederte Elektronik. Der biologische Rezeptor kann auf unterschiedliche Weise an den Wandler bzw. Transduktoren gebunden vorliegen.

Figur 6 zeigt schematisch eine funktionalisierte Lumazinsynthase mit 60 gleichen bzw. unterschiedlich modifizierten Untereinheiten, die über einen Anker (Peptid, Fettsäure,

sonstige funktionelle Gruppen) mit einer Oberfläche (beispielsweise Wandleroberfläche, Membran, sonstige Oberflächen, etc.) verbunden ist. Die Detektionsempfindlichkeit für Fremdmolekülbindung auf der Oberfläche der Lumazinsynthase wird durch eine hohe Anzahl funktioneller Gruppen (beispielsweise Epitope zur Antikörpererkennung, Antikörper zur Detektion von Fremdmolekülen in Lösung oder sonstige Rezeptoren) erhöht.

Figur 7 zeigt schematisch einen möglichen Aufbau eines Feldeffekttransistors unter Einbeziehung einer multimeren, funktionalisierten Lumazinsynthase. Eine Veränderung der Oberflächenladung an der Torelektrode, die durch die Bindung eines Fremdmoleküls an die Oberfläche der Lumazinsynthase eintritt, moduliert dabei den Stromfluß durch den Feldeffekttransistor.

Figur 8 zeigt einen Sequenzvergleich von Lumazinsynthasen aus folgenden Organismen: 1. *Mycobacterium avium*; 2. *Mycobacterium tuberculosis*; 3. *Corynebacterium ammoniagenes*; 4. *Chlorobium tepidum*; 5. *Aquifex aeolicus*; 6. *Thermotoga maritima*; 7. *Bacillus subtilis*; 8. *Bacillus amyloliquefaciens*; 9. *A. pleuropneumoniae*; 10. *Streptococcus pneumoniae*; 11. *Staphylococcus aureus*; 12. *Vibrio cholerae*; 13. *Photobacterium phosphoreum*; 14. *S. putrefaciens*; 15. *Photobacterium leiognathi*; 16. *Shigella flexneri*; 17. *Escherichia coli*; 18. *Haemophilus influenzae*; 19. *Dehalospirillum multivorans*; 20. *Helicobacter pylori*; 21. *Deinococcus radiodurans*; 22. *Synechocystis* sp.; 23. *Porphyromonas gingivalis*; 24. *Arabidopsis thaliana*; 25. *Methanococcus jannaschii*; 26. *Archaeoglobus fulgidus*; 27. *Methanobacterium thermoautotrophicum*; 28. *Chlamydia trachomatis*; 29. *Saccharomyces cerevisiae*; 30. *Brucella abortus*. Die Proteinsequenzen wurden durch Übersetzung der zugrundeliegenden DNA-Sequenzen erhalten. Die gezeigte Sequenzmenge wurde erhalten durch Datenbanksuche unter Verwendung der Suchalgorithmen nach Altschul et al. (1997) und der Sequenz der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* als Suchmatrize.

Figur 9 zeigt die Aufsicht auf eine pentamere Untereinheit der ikosaedrischen Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*. Der Ligand 5-Nitro-6-(D-ribitylamino)-2,4-(1H,3H)-pyrimidindion bindet in der Kontaktstelle zwischen zwei monomeren Untereinheiten (Ladenstein et al., 1988, 1994; Ritsert et al., 1995).

Figur 10 zeigt ein Modell der ikosaedrischen Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*. Eine von 12 pentameren Untereinheiten ist durch die Verwendung unterschiedlicher Grautöne hervorgehoben. Sowohl der N- als auch der C-Terminus liegen an der Oberfläche und sind frei zugänglich.

Figur 11 zeigt die in den Ausführungsbeispielen verwendeten Expressionsvektoren. SD, ribosomale Bindungsstelle; MCS, Klonierungskassette mit singulären Schnittstellen; t_0 , t_1 , Terminatorsequenzen; (cat), nicht aktives Gen für die Chloramphenicolacetyltransferase (verschobener Leserahmen); (Δ cat), inaktives Gen für die Chloramphenicolacetyltransferase (Deletion); Restriktionsschnittstellen sind durch Buchstaben gekennzeichnet: B, BamHI; E, EcoRI; H, HindIII; N, NcoI; P, PstI; S, SalI. Translationsstart im Vektor pNCO113 bei Position 113 und an Position 233 bei p602/-CAT.

Figur 12 beschreibt die 1. PCR zur Einführung einer Mutation am Beispiel des Austausches der Aminosäure Cystein an Position 93 gegen Serin im Gen der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*. Im ersten Schritt der gerichteten Mutagenese werden zuerst zwei getrennte PCR-Ansätze, mit den Oligonukleotidepaarungen PNCO-M1/C93S und PNCO-M2/RibH-3 und dem Expressionsplasmid *pNCO-BS-LuSy* als Matrize, durchgeführt. Fragment A enthält die beabsichtigte Mutation und eine intakte Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease EcoRI. Fragment B repräsentiert das gesamte, aber unmutiert vorliegende ribH-Gen (Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*). In diesem Fragment ist die 5'-Klonierungsschnittstelle deletiert. (R: ribosomale Bindungsstelle)

Figur 13 beschreibt die 2. PCR bei der Einführung einer Mutation. Im zweiten Schritt der Mutagenese wird die eingeführte Mutation, die sich jetzt noch am Ende 3'-Ende des durch PCR generierten Gen-Fragmentes befindet, durch überlappende Verlängerung, in das gesamte Gen eingeführt.

Figur 14 beschreibt die 3. PCR zur Einführung einer Mutation. Die 3. PCR dient der Vermehrung des verlängerten Codonstranges von Fragment A.

In den Figuren 15 bis 24, 26 bis 28 und 30 und 31 ist die Sequenz der jeweils verwendeten Lumazinsynthase durch Fettdruck gekennzeichnet. Die Linkerregionen sind unterstrichen. Erkennungssequenzen für die jeweiligen Restriktionsendonukleasen sind kursiv und unterstrichen. Fusionierte Sequenzen, bzw. Aminosäuren, die nicht zur Linkersequenz gezählt werden, sind punktiert unterstrichen. Die Aminosäuresequenz ist im Einbuchstaben-Code angegeben.

Figur 15 zeigt die Struktur des Vektors *pNCO-N-BS-LuSy* zur Fusion von Fremdproteinen an den N-Terminus der Lumazinsynthase.

Figur 16 zeigt die Struktur des Vektors *pNCO-C-BS-LuSy* zur Fusion von Fremdproteinen an den C-Terminus der Lumazinsynthase.

Figur 17 zeigt die Struktur des Vektors *pNCO-BS-LuSy-EC-DHFR*.

Figur 18 zeigt die Struktur des Vektors *pNCO-N-VP2-BS-LuSy* im Bereich des N-Terminus.

Figur 19 zeigt die Struktur des Vektors *pNCO-C-VP2-BS-LuSy* im Bereich des C-Terminus.

Figur 20 zeigt die Struktur des Vektors *pNCO-C-Biotag-BS-LuSy* im Bereich des C-Terminus.

Figur 21 zeigt die Struktur des Vektors *pNCO-Lys165-BS-LuSy* im Bereich des C-Terminus.

Figur 22 zeigt die Struktur des Vektors *pNCO-Cys167-BS-LuSy* im Bereich des C-Terminus.

Figur 23 zeigt die Struktur des Vektors *pFLAG-MAC-BS-LuSy* im Bereich des N-Terminus.

Figur 24 zeigt die Struktur des Vektors *pNCO-C-His6-BS-LuSy* im Bereich des C-Terminus.

Figur 25 zeigt die Konstruktion der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* (Deckert et al., 1998) unter Verwendung von 11 synthetischer Oligonukleotide (AQUI-1 bis AQUI-11) und einer 6-stufigen Polymerase-Kettenreaktion.

Figur 26 zeigt die Kopplung eines artifiziellen 13 Aminosäuren langen, *in vivo* biotinylierfähigen Peptids, an den C-Terminus der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*. (Peptid ist über einen Linker mit 3 Alaninresten an den C-Terminus des Trägerproteins gebunden)

Figur 27 zeigt die Kopplung eines artifiziellen 13 Aminosäuren langen, *in vivo* biotinylierfähigen Peptids, über einen Linker aus 6 Histidin- und 3 Alaninresten an den C-Terminus der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*.

Figur 28 zeigt die Kopplung eines artifiziellen 13 Aminosäuren langen, *in vivo* biotinylierfähigen Peptids, über einen Linker bestehend aus 6 Histidinresten und der Sequenz Gly-Gly-Ser-Gly-Ala-Ala-Ala an den C-Terminus der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*.

Figur 29 zeigt die Herstellung eines chimären Proteins bestehend aus einem Teil der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* und einem Teil der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*. (RBS: ribosomale Bindungsstelle)

Figur 30 zeigt den 5'-Bereich des Vektors *pNCO-AA-BglII-LuSy* bzw. des Vektors *pNCO-AA-BglII-LuSy-(BamHI)* zur Fusion von Fremdgenen an das 5'-Ende der Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*. Die neu in die Sequenz eingeführte Erkennungssequenz für die singuläre Restriktionsendonuklease BglII ist eingezzeichnet.

Figur 31 zeigt den 3'-Bereich des Vektors *pNCO-AA-LuSy-(BamHI)* bzw. des Vektors *pNCO-AA-BglII-LuSy-(BamHI)* zur Fusion von Fremdgenen an das 3'-Ende der Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*. An den C-Terminus des Trägerproteins ist ein Peptid mit der Sequenz GSVDLQPSLIS fusioniert.

Die angeführten DNA-Sequenzprotokolle erläutern den Aufbau, der in den Beispielen angeführten Plasmide. In den Sequenzprotokollen sind die Erkennungssequenzen der jeweiligen verwendeten Restriktionsendonukleasen kursiv und unterstrichen; die exprimierten Fusionsproteine sind jeweils fettgedruckt und Linkersequenzen sind punktiert unterstrichen; auf Ausnahmen in der Zeichenformatierung wird hingewiesen.

SEQ ID No.1 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO113*. (Vektor zur Expression von Genen in *Escherichia coli*; Stüber et al., 1990)

SEQ ID No.2 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *p602-CAT*. (Schaukelvektor zur Expression von Genen in *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*; Henner, 1990; LeGrice, 1990)

SEQ ID No.3 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsplasmides *pNCO-BS-LuSy*. (Expressionsplasmid mit der unveränderten Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* zur Expression in *Escherichia coli*)

SEQ ID No.4 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsplasmides *p602-BS-LuSy*. (Expressionsplasmid mit der unveränderten Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* zur Expression in *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*)

SEQ ID No.5 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsplasmides *pNCO-BS-LuSy-C93S*. (Expressionsplasmid mit einer veränderten Lumazinsynthase-Variante, wobei die Aminosäure Cystein an Position 93 durch die Aminosäure Serin ausgetauscht wurde)

SEQ ID No.6 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsplasmides *pNCO-BS-LuSy-C139S*. (Expressionsplasmid mit einer veränderten Lumazinsynthase-Variante, wobei die Aminosäure Cystein an Position 139 durch die Aminosäure Serin ausgetauscht wurde)

SEQ ID No.7 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsplasmides *pNCO-BS-LuSy-C93/139S*. (Expressionsplasmid mit einer veränderten Lumazinsynthase-Variante, wobei die Aminosäure Cystein an den Positionen 93 und 139 durch die Aminosäure Serin ausgetauscht wurde)

SEQ ID No.8 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-N-BS-LuSy* zur Fusion von Fremdpeptiden an den N-Terminus der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*.

SEQ ID No.9 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-C-BS-LuSy* zur Fusion von Fremdpeptiden an den C-Terminus der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*.

SEQ ID No.10 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-EC-DHFR-BS-LuSy*. (Expressionsplasmid zur Expression eines Fusionsproteins, bestehend aus der Dihydrofolatreduktase aus *Escherichia coli* und der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, wobei die Dihydrofolatreduktase an den N-Terminus der Lumazinsynthase fusioniert vorliegt)

SEQ ID No.11 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-EC-MBP-BS-LuSy*. (Expressionsplasmid zur Expression eines Fusionsproteins, bestehend aus dem maltosebindenden Protein aus *Escherichia coli* und der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, wobei das maltosebindene Protein an den N-Terminus der Lumazinsynthase fusioniert vorliegt)

SEQ ID No.12 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-BS-LuSy-EC-DHFR*. Die Linkersequenz zwischen der Lumazinsynthase und der Dihydrofolatreduktase ist punktiert unterstrichen. (Expressionsplasmid zur Expression eines Fusionsproteins, bestehend aus der Dihydrofolatreduktase aus *Escherichia coli* und der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, wobei die Dihydrofolatreduktase an den C-Terminus der Lumazinsynthase fusioniert vorliegt)

SEQ ID No.13 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-N-VP2-BS-LuSy*. (Expressionsplasmid zur Expression eines Fusionsproteins, bestehend aus der VP2-Domäne des 'Minc enteritis Virus' und der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, wobei sich die VP2-Domäne am N-Terminus befindet; das ehemalige Startcodon der Lumazinsynthase ist unterstrichen)

SEQ ID No.14 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-C-VP2-BS-LuSy*. (Expressionsplasmid zur Expression eines Fusionsproteins, bestehend aus der VP2-Domäne des 'Minc enteritis Virus' und der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, wobei sich die VP2-Domäne am C-Terminus befindet)

SEQ ID No.15 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-N/C-VP2-BS-LuSy*. (Expressionsplasmid zur Expression eines Fusionsproteins, bestehend aus der VP2-Domäne des 'Minc enteritis Virus' und der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, wobei sich die VP2-Domäne sowohl am N-Terminus als auch am C-Terminus befindet; das ehemalige Startcodon der Lumazinsynthase ist unterstrichen)

SEQ ID No.16 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-C-Biotag-BS-LuSy*. (Expressionsplasmid zur Expression eines Fusionsproteins, bestehend aus einem 13 Aminosäuren langen, *in vivo* biotinylierfähigen Peptid und der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, wobei sich das fusionierte Peptid am C-Terminus befindet)

SEQ ID No.17 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-Lys165-BS-LuSy*. (Expressionsplasmid zur Expression einer veränderten Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, bei der der C-Terminus verlängert wurde und mit einem Lysinrest endet; das Codon für Lysin (AAA) ist unterstrichen)

SEQ ID No.18 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-Cys167-BS-LuSy*. (Expressionsplasmid zur Expression einer veränderten Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, bei der der C-Terminus verlängert wurde und mit einem Cysteinrest endet; das Codon für Cystein (TGC) ist unterstrichen)

SEQ ID No.19 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pFLAG-MAC-BS-LuSy*. (Expressionsplasmid zur Expression eines Fusionsproteins, bestehend aus einem 12 Aminosäuren langen Epitop, welches von einem monoklonalen Antikörper erkannt wird, und der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, wobei sich das fusionierte Peptid am N-Terminus befindet; das ehemalige Startcodon der Lumazinsynthase ist unterstrichen)

SEQ ID No.20 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-C-His6-BS-LuSy*. (Expressionsplasmid zur Expression eines Fusionsproteins, bestehend aus einem 6 Aminosäuren langen Peptid (6 x Histidin) und der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, wobei sich das fusionierte Peptid am C-Terminus befindet; das Peptid ist unterstrichen)

SEQ ID No.21 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-AA-LuSy*. (Expressionsplasmid zur Expression der unveränderten, thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*; die DNA-Sequenz wurde an die Codon-Verwendung von *Escherichia coli* angepasst; die DNA wurde vollsynthetisch hergestellt)

SEQ ID No.22 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-C-Biotag-AA-LuSy*. (Expressionsplasmid zur Expression eines Fusionsproteins, bestehend aus einem 13 Aminosäuren langen, *in vivo* biotinylierfähigen Peptid und der Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*, wobei sich das fusionierte Peptid am C-Terminus befindet; das Peptid ist über einen Linker mit 3 Alaninresten mit dem C-Terminus des Trägerproteins verbunden)

SEQ ID No.23 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-His6-C-Biotag-AA-LuSy*. (Expressionsplasmid zur Expression der Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* mit C-

terminal, über einen Linker aus 6 Histidin- und 3 Alaninresten gekoppeltem, *in vivo* biotinylierfähigem Peptid)

SEQ ID No.24 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-His6-GLY2-SER-GLY-C-Biotag-AA-LuSy*. (Expressionsplasmid zur Expression der Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* mit C-terminal, über einen Linker bestehend aus der Aminosäurenfolge HHHHHGGSGAAA gekoppeltem, *in vivo* biotinylierfähigem Peptid)

SEQ ID No.25 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-BS-LuSy-AgeI-AA-Lusy*. (Expressionsplasmid zur Expression eines chimären Proteins bestehend aus einem Teil Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* und einem Teil der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*; der Anteil der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* ist fettgedruckt, der Anteil der Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* ist doppelt unterstrichen)

SEQ ID No.26 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-AA-BglII-LuSy*. (Vektor zur Fusion von Fremdpeptiden an den N-Terminus bzw. an das 5'-Ende der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* unter Verwendung der Restriktionsendonuklease BglII).

SEQ ID No.27 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-AA-LuSy-(BamHI)*. (Vektor zur Fusion von Fremdpeptiden an den C-Terminus bzw. an das 3'-Ende der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* unter Verwendung der Restriktionsendonuklease BamHI)

SEQ ID No.28 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-AA-BglII-LuSy-(BamHI)*. (Vektor zur Fusion von Fremdpeptiden an den N- und an den C-Terminus bzw. an das 5'- und an das 3'-Ende der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen BglII und BamHI)

Die verwendeten Bakterienstämme werden bei der DSM gemäß Budapester Vertrag hinterlegt. Die Hinterlegungsnummern werden nachgereicht.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen näher erläutert.

Die in den Ausführungsbeispielen verwendeten Stämme von *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* sind im folgenden mit Genotyp und Literaturstelle aufgeführt.

Stamm	Genotyp	Literatur
-------	---------	-----------

Bacillus subtilis Klonierstamm

BR151[pBL1]	trp. met. lys	Lovell, 1981
<i>Escherichia coli</i> Klonierstämme		
XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, Bullock et al., supE44, relA1, lac[F'], proAB, 1987 lacI ^q ZΔM15, Tn10(tet ^r)]	
RR28	F ^r , thi, pro, lac, gal, ara, mtl, xyl, Hennecke et al., supE44, endA, hsd(r ^r , m ^r), pheS, recA	1982

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Gibco BRL, Eggenstein und MWG-Biotech, Ebersberg im Rahmen einer Auftragssynthese hergestellt.

Beispiel 1**Heterologe Expression des Gens der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli* XL1**

A) Das Gen für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* wurde mit den Oligonukleotiden RibH-1 (5' gag gag aaa tta acc atg aat atc ata caa gga aat tta g 3'), welches am 3'-Ende zum 5'-Ende des Lumazinsynthasegens komplementär ist und am 5'-Ende für einen Teil einer optimierten ribosomalen Bindungsstelle kodiert, und RibH-2 (5' tat tat gga tcc cca tgg tta ttc gaa aga acg gtt taa gtt tg 3'), welches am 3'-Ende zum Gen der Lumazinsynthase komplementär ist und hinter dem Stopcodon eine Erkennungssequenz für die Endonuklease BamHI (G*GATCC) einführt, aus dem Plasmid pRF2 (Perkins et al., 1991), welches das gesamte RIB-Operon aus *Bacillus subtilis* enthält, amplifiziert (Mullis et al., 1986).

10 µl PCR-Puffer (75 mM Tris/HCl, pH 9.0; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0.01 % (w/v) Tween 20)

6 µl Mg²⁺ [1,5 mM]

8 µl dNTP's [je 200 µM]

1 µl RibH-1 [0,5 µM]

1 µl RibH-2 [0,5 µM]

1 µl pRF2 [10 ng]

1 µl Goldstar-Taq-Polymerase [0,5 U] (Eurogentec, Seraing, Belgien)

72 µl H₂O_{bidest}

Der Ansatz wurde im Thermocycler (GeneAmp[®] PCR System 2400; Perkin Elmer) bei folgenden Bedingungen durchgeführt: 1. 5,0 min 95 °C

2. 0,5 min 94 °C

3. 0,5 min 50 °C

4. 0,8 min 72 °C

5. 7,0 min 72 °C

6. abkühlen auf 4 °C

Die Schritte 2. - 4. wurden 20 x wiederholt.

B) Der PCR-Ansatz wurde mittels Agarosegelektrophorese aufgetrennt, die DNA durch Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und das Fragment mit einer Länge von 498 bp mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gelstück

wurde gewogen und mit der 5-fachen Menge an 6 M NaJ-Lösung versetzt. Nach Aufschmelzen des Gelstückes wurde zu dieser Lösung Glasmilch (Geneclean II-Kit, Bio101; San Diego, CA) zugegeben (2 µl Glasmilch pro 1 µg DNA). Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde die Suspension zentrifugiert (Eppendorfzentrifuge, 8000 Umin⁻¹, 2 min, 4 °C), der Überstand verworfen und die Glasmilch mit 500 µl NEW-Waschlösung (Zusammensetzung vom Hersteller nicht angegeben) suspendiert, zentrifugiert (s.o.) und der Überstand anschließend vollständig entfernt. Die Elution der DNA erfolgte mit 30 µl bidestilliertem Wasser (45 °C, 15 min). Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte fluorometrisch unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Bisbenzimid H 33258 (Höchst, Frankfurt). In Gegenwart von DNA liegt das Absorptionsmaximum dieses Farbstoffes bei 365 nm, das Emissionsmaximum bei 458 nm. Das verwendete Fluorometer arbeitet mit einer Quecksilberlampe und benutzt zur Anregung eine Wellenlänge von 365 nm in einer Bandbreite von 100 nm. Die Messung der Emission erfolgt mittels eines Photomultipliers bei 460 nm in einer Bandbreite von 10 nm. Die Nulleichung erfolgte mit 2 ml TNE-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 7.4, 10 mM EDTA, 1 M NaCl), der 0,1 µg/ml Farbstoff enthielt. Anschließend wurden 2 µl eines Eichstandards mit bekannter DNA Konzentration (Plasmid-DNA) zugeben und diese Konzentration am Fluorometer eingestellt. Nachdem der Nullpunkt des Gerätes mit Puffer/Farbstoff-Lösung überprüft worden war, wurden 2 µl der DNA-Probe unbekannter Konzentration zugegeben und die Konzentration in µg/µl abgelesen.

C) 10 ng der isolierten DNA aus B) dienten anschließend als Matrize für eine 2. Polymerasekettenreaktion mit den Oligonukleotiden EcoRI-RBS-1 (5' ata ata gaa tt_c att aaa gag gag aaa tta acc atg 3'), welches die ribosomale Bindungsstelle vervollständigt und unmittelbar vor der ribosomalen Bindungsstelle eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease EcoRI (G*ATT_C) in das DNA-Fragment einführt, und RibH-2:

10 µl PCR-Puffer

6 µl Mg²⁺ [1.5 mM]

8 µl dNTP's [je 200 µM]

1 µl EcoRI-RBS [0,5 µM]

1 µl RibH-2 [0,5 µM]

1 µl DNA aus der 1.PCR [10 ng]

1 µl Goldstar-Taq-Polymerase [0,5 U] (Eurogentec, Seraing, Belgien)

72 µl H₂O_{bidest}

Der Ansatz wurde im Thermocycler (GeneAmp[®] PCR System 2400; Perkin Elmer) bei folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. 5,0 min 95 °C
2. 0,5 min 94 °C
3. 0,5 min 50 °C
4. 0,8 min 72 °C
5. 7,0 min 72 °C
6. abkühlen auf 4 °C

Die Schritte 2. - 4. wurden 30 x wiederholt.

D) Der PCR-Ansatz wurde mittels Agarosegelektrophorese aufgetrennt und das Fragment mit einer Länge von 516 bp wie unter B) beschrieben gereinigt.

E) Das isolierte DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI verdaut.

30,0 µl Fragment aus D)

2,5 µl EcoRI [62,5 U]

3,0 µl BamHI [60 U]

24,0 µl OPAU (10 x: 500 mM Kaliumacetat: 100 mM Magnesiumacetat: 100 mM Tris-Acetat, pH 7,5)

60,5 µl H₂O_{bidest}

Die Restriktionsenzyme wurden von der Firma Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen. Der Ansatz wurde 180 min bei 37 °C inkubiert und wie unter B) beschrieben gereinigt und zur Ligation eingesetzt.

F) Der Expressionsvektor pNCO113 wurde mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI verdaut.

25,0 µl pNCO113 [5 µg]

2,5 µl EcoRI [62,5 U]

3,0 µl BamHI [60 U]

24,0 µl OPAU (10 x)

65,5 µl H₂O_{bidest}

Der Ansatz wurde ebenfalls 180 min bei 37 °C inkubiert und das entstandene DNA-Fragment mit einer Länge von 3387 bp wie unter B) beschrieben gereinigt und zur Ligation eingesetzt.

G) Ligation der DNA-Fragmente aus E) und F) in einem molaren Verhältnis von 3 : 1.
(Sgamarella, 1979)

1 µl Expressionsvektor aus F) [50 fmol]
2 µl DNA-Fragment aus E) [150 fmol]
4 µl H₂O_{bidest}
mischen, 10 min auf 55 °C erwärmen und dann 5 min auf Eis stellen
2 µl T₄-Puffer (5 x: 250 mM Tris/HCl, pH 7.6; 50 mM MgCl₂; 5 mM ATP; 5 mM DTT; 25 % (w/v) Poly-
ethyleneglycol-8000)
1 µl T₄-Ligase [1 U] (Gibco BRL, Eggenstein)

Der Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert und das Plasmid *pNCO-BS-LuSy* erhalten.

H) Herstellung elektrokompetenter *Escherichia coli* XL1-Zellen (Dower et al., 1988): 1 Liter LB-Medium wurde 1:100 mit einer bei 28 °C gewachsenen Übernachtkultur angeimpft und bei 37 °C im Schüttelinkubator bis zu einer optischen Dichte (600 nm) von 0,5 bis 0,7 (frühe bis mittlere logarithmische Phase) bebrühtet. Die Bakterienkultur wurde zum Anhalten des Zellwachstums 15 min auf Eis gestellt und danach zur Gewinnung der Zellmasse zentrifugiert (Sorvall-GS-3-Rotor, 2300 U/min⁻¹, 4 °C, 15 min). Das Zellpellet wurde dann in 1 l eiskalter und steriler 10 %iger Glycerinlösung suspendiert und abermals zentrifugiert. Es folgten zwei weitere Waschschritte (500 ml 10 %ige Glycerinlösung; 20 ml 10 %ige Glycerinlösung) mit anschließender Zentrifugation. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Rückstand in 2-3 ml 10 %iger Glycerinlösung aufgenommen und auf Eis gestellt. Elektroporationszelle und Küvettenhalter wurden 15 min auf Eis vorgekühlt. In einem vorgekühlten 0,5 ml Eppendorf-Gefäß wurden 40 µl der vorbereiteten Zellsuspension mit 1-2 µl des Ligationsansatzes aus G) vermischt und anschließend in die vorgekühlte Elektroporationszelle (0,1 cm) pipettiert. Die Elektroporation wurde bei 25 µF, 1,8 kV, 200 Ω (BioRad, München) durchgeführt, wobei die Zeitkonstante der Elektroporation bei 4-5 msec lag. Unmittelbar nach dem Elektroporationsvorgang wurde die Zellsuspension mit 1 ml SOC-Medium (2 % Pepton; 0.5 % Hefe-Extrakt; 10 mM NaCl; 2.5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM Glucose) versetzt und in ein steriles 10 ml Gefäß überführt. Zur phänotypischen Expression wurden die Zellen 1 h bei 37 °C im Schüttler bebrühtet und anschließend in 20 µl und 200 µl Portionen auf LB-Amp-Platten (21 g/l Agar; 10 g/l Caseinhydrolysat; 5 g/l Hefeextrakt;

5 g/l NaCl; 150 mg/l Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert und der Expressionsstamm XL1-*pNCO-BS-LuSy* erhalten.

I) Die Isolierung der Expressionsplasmide (*pNCO-BS-LuSy*) aus den unter H) erhaltenen Expressionsstämmen (XL1-*pNCO-BS-LuSy*) wurde nach Birnboim und Doly (1979) durchgeführt. Zellen aus einer 100 ml Übernacht-Kultur (10 g/l Caseinhydrolysat; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; 150 mg/l Ampicillin) wurden in 4 ml Puffer S1 (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg Rnase A/ml, pH 8.0) suspendiert und anschließend mit 4 ml Puffer S2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) versetzt. Nach vorsichtigem Umschwenken des Probengefäßes und einer 5 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Mischung mit 4 ml Puffer S3 (2,6 M KAc, pH 5,2) versetzt, gemischt und 20 min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation (SS34-Rotor, 17000 Umin⁻¹, 4 °C, 30 min) wurde der Überstand unter Verwendung von Nucleobond®AX100 Säulen (Macherey und Nagel, Düren) gereinigt. Das Säulenmaterial wurde mit 2 ml Puffer N2 (0,9 M KCl; 100 mM Tris-Phosphat, pH 6,3; 15 % (v/v) Ethanol) äquilibriert und anschließend der Überstand aufgetragen. Nach Auswaschung von Verunreinigungen mit 8 ml Puffer N3 (1,3 M KCl, pH 6,3) wurde die DNA mit 2 ml Puffer N5 (1,3 M KCl, pH 8,0) eluiert. Aus dem Eluat wurde die DNA mit 0,7-fachen Volumen Isopropanol gefällt, 2x mit eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 200 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen.

J) Die Sequenzierung der Plasmid-DNA (pNCO-BS-LuSy) wurde nach der Kettenabbruchmethode von Sanger et al. (1971) mit markierten Terminatoren und Taq-DNA-Polymerase durchgeführt. Der Sequenzieransatz enthielt 1 µg Plasmid-DNA aus I), 10 pmol Sequenzieroligonukleotid Seq-1 (5' gtg agc gga taa caa ttt cac aca g 3'), 10 µl Terminator Premix™ (dNTP's, ddNTP's, markierte ddNTP's und Taq-DNA-Polymerase) von ABI (Weiterstadt) und wurde mit bidest. Wasser auf ein Endvolumen von 21 µl aufgefüllt (lichtgeschützt durchgeführt, da markierte ddNTP's lichtempfindlich sind). Die Reaktion wurde in einer GeneAmpPCR System 2400 Maschine von Perkin Elmer (Norwalk, Connecticut, USA) mit folgendem Programm durchgeführt:

15 s/96 °C (Denaturierung der DNA)

15 s/50 °C (Annealing des Primers)

4 min/72 °C (Vermehrung der DNA)

Die Polymerasereaktion wurde 25 mal hintereinander durchgeführt.

Nach der Polymerase-Reaktion wurden 80 µl bidest. Wasser zum Ansatz gegeben und zweimal mit je 100 µl Phenol/Chloroform/Amylalkohol-Mischung (25:24:1) von ABI

(Weiterstadt) ausgeschüttelt, wobei die schwerere, rötlich gefärbte, Chloroform enthaltende Phase verworfen wurde. Das Ausfällen der DNA erfolgte mit 300 µl absolutem Ethanol in Anwesenheit von 10 µl einer 3 M Natriumacetat-Lösung. Die DNA wurde anschließend durch Zentrifugation (Eppendorf-Rotor, 14000 Umin⁻¹, RT, 30 min) pelletiert, der Rückstand mit eiskalter 70 %iger Ethanol-Lösung gewaschen und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Das trockene DNA-Pellet wurde in einer Mischung aus 1 µl 50 mM EDTA, pH 8,0 und 5 µl Formamid aufgenommen und zur Denaturierung der DNA 2 min auf 95 °C erhitzt und danach sofort auf Eis gekühlt. 1,5 µl dieser Proben wurden dann auf ein 4,75 %iges Polyacrylamid-Sequenziergel aufgetragen. Zur Erstellung des Sequenziergels wurden 13,3 ml UltraPureSequagelTM Sequencing-System-Konzentrat von National Diagnostics (Atlanta, Georgia, USA) mit 49,7 ml UltraPureSequagelTM Sequencing-System-Diluent vermischt und mit einer Spatelspitze von Amberlite MB-1 entionisiert. Die Suspension wurde anschließend filtriert (0,2 µm Filter) und 7 ml UltraPureSequagelTM Sequencing-System-Puffer zugegeben. Nachdem 10 min unter Wasserstrahl-Vakuum entgast worden war, wurden 210 µl einer 10 %igen Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und 25 µl TEMED zugegeben und in einen vorbereiteten Gelträger gegossen. Die Auftrennung der markierten DNA-Fragmente erfolgte in TBE-Puffer (1 M Tris-Base, pH 8,3; 0,85 M Borsäure; 10 mM EDTA) in einem Zeitraum von 7 h auf einem PrismTM 377-DNA-Sequencer von Perkin-Elmer-ABI (Weiterstadt).

K) Expressionsplasmide, die ein korrekt eingebautes Gen für die Lumazinsynthase enthielten wurden anschließend in LB-AMP-Medium (10 g/l Caseinhydrolysat; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; 150 mg/l Ampicillin) kultiviert. Anzuchten wurden in einem Volumen von 25 ml in 100 ml Erlenmeyerkolben durchgeführt. Es wurde zunächst eine Übernachtkultur (ca. 15 ml) Zellen aus H), welche aus einer Einzelkolonie stammten, angeimpft. Die Hauptkultur wurde 1:50 (v/v) mit der Übernachtkultur angeimpft. Das Wachstum von Flüssigkulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) gegen unbewachsene Medium als Nullwert verfolgt. Die Expressionsstämme wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 angezogen und dann die Transkription des Lumazinsynthasegens mit IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) in einer Konzentration von 2 mM induziert. Nach erfolgter Fermentation (nach Induktion weitere 5 h) wurden die Zellen mittels Zentrifugation (5000 Umin⁻¹, 4 °C, 15 min) geerntet, mit Saline gewaschen (20 % des Volumens der Hauptkultur; Saline: 0,9 % NaCl-Lsg.) und bei -20 °C bis zu einer weiteren Verwendung gelagert.

L) Der Aufschluß der Zellen aus K) erfolgte unter Verwendung einer Ultraschall-erzeugenden Apparatur (Branson-Sonifier B-12A. Branson SONIC Power Company, Dunbury, Connecticut). Zum Aufschluß wurde das gewaschene Zellpellet in 800 µl Aufschlußpuffer (50 mM K-Phosphat, pH 7,0; 10 mM EDTA; 10 mM Na₂SO₃; 0,3 mM PMSF; 0,02 % Na-triumazid) suspendiert und 10 min auf Eis gekühlt. Die Zellsuspension wurde dann 8 sec mit der Nadelsonde des Ultraschallgerätes bei Stufe 4,5 behandelt. Anschließend wurde die Suspension 5 min auf Eis gekühlt und nochmals einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Die Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert (Eppendorff-Zentrifuge; 15000 Umin⁻¹, 4 °C, 15 min) und der Überstand (Rohextrakt) zur weiteren Verarbeitung eingesetzt.

M) Zur Überprüfung der Expressionsrate bzw. der Größe des monomeren Proteinstranges (Lumazinsynthase), wurde eine denaturierende Polyacrylamidelektrophorese nach Laemmli (1970) durchgeführt. Routinemäßig wurden Gele mit 4 % Acrylamid im Sammelgel und 16 % Acrylamid im Trengel angefertigt (Acrylamidstammlösung: 38,8 % (w/v) Acrylamid; 1,2 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid). Die Rohextrakte aus L) wurden 1:2; 1:5 oder 1:10 mit Protein-Auftragspuffer (20 % Glycerin; 4 % 2-Mercaptoethanol; 4 % (w/v) SDS; 0,05 % Bromphenolblau) verdünnt und 15 min auf siedendem Wasserbad gekocht. Nach dem Abkühlen wurden die verbliebenen unlöslichen Bestandteile der Proben in einer Eppendorfzentrifuge pelletiert (15000 Umin⁻¹, 5 min, 4 °C) und 8 µl des klaren Überstandes auf das Sammelgel aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard diente Dalton Mark VII-L von Sigma (Deisenhofen) mit Proteinbanden bei 66, 44, 36, 29, 24, 20 und 14 kDa (Im Folgenden als Markerproteine bezeichnet). Die Elektrophorese wurde bei konstant 20 mV je SDS-Gel durchgeführt. Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte anschließend unter Verwendung von Coomassie-Färbelösung (40 % Methanol; 10 % Essigsäure; 0,2 % (w/v) Coomassie Blue R 250). Zur Entfärbung des nicht mit Proteinmatrix versetzten Acrylamidgels wurde eine Coomassie-Entfärbelösung verwendet (40 % Methanol; 10 % Essigsäure (tech.); 50 % Wasser). Im Rohextrakt des Stammes XL1-pNCO-BS-LuSy konnte eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 16 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne pNCO-BS-LuSy-Expressionsplasmid nicht zu sehen war. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca. 10 % bezogen auf alle löslichen Proteine (geschätzt).

N) Die Überprüfung der Funktionalität der 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazinsynthase erfolgte unter Verwendung der natürlichen Substrate (5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion und L-3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat: Bacher et al.. 1997). Der Ansatz enthielt

100 mM K-Phosphat-Puffer pH 7,0, 4 mM EDTA, 0,6 mM 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion (PYR; hergestellt durch katalytische Hydrierung von 5-Nitro-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion), 2 mM DTT, 1 mM L-3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (DHP) und Rohextrakt aus L). Die Mischung wurde zuerst ohne PYR 3 min vorinkubiert und die Enzymreaktion dann durch Zugabe von PYR gestartet. Der Testansatz wurde bei 37 °C inkubiert. Von der Mischung wurden nach unterschiedlichen Zeitintervallen (2, 5 und 10 min) Portionen entnommen, die Reaktion durch Zugabe von TCA (15 % in Wasser) abgestoppt und zentrifugiert (15000 Umin⁻¹, 5 min, RT). Die Auswertung erfolgte mittels HPLC an der reversen Phase Nucleosil 10C₁₈ (4 x 250 mm). Die Konzentration des gebildeten 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazins wurde durch Fluoreszenzdetektion (Anregung: 407 nm; Emission: 487 nm) bestimmt. Der Elutionspuffer enthielt 7 % Methanol und 30 mM Ameisensäure. Als Standard diente chemisch synthetisiertes 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin. Eine Einheit (1 U) 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazinsynthase katalysiert bei 37 °C die Bildung von 1 nmol 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin je Stunde. Im Rohextrakt des Stammes XL1-pNCO-BS-LuSy konnte eine Volumenaktivität von ca. 15600 U/ml gemessen werden. Nach Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration nach O) (13 mg/ml) konnte eine spezifische Aktivität von ca. 1200 U/mg berechnet werden.

- O) Die Bestimmung des Proteins im Rohextrakt erfolgte nach einer Variante der Methode von Bradford (Read und Northcote, 1981; Compton und Jones, 1985). Das Farbstoffreagenz wurde durch Auffüllen von 0,1 g Serva Blue G, 100 ml 16 M Phosphorsäure und 47 ml
- P) Ethanol in Wasser gewonnen, filtriert und im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt. Die Rohextrakte wurden mit einem Puffer, der 2,0 g Na₂HPO₄, 0,6 g KH₂PO₄, 7,0 g NaCl und 0,2 g Natriumazid pro Liter Wasser enthielt, 50-fach verdünnt. Zu 50 µl dieser Lösung wurden 950 µl Reagenz gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm gegen eine Leerprobe aus 50 µl Puffer auf 950 µl Reagenz bestimmt. Für jede Probe erfolgte eine Dreifachbestimmung. Die Ergebnisse wurden mittels einer mit BSA (Rinderserumalbumin) als Standard erhaltenen Eichgeraden in Proteinkonzentrationen umgerechnet.
- Q) Für die Negativkontrastierung wurden Trägernetzchen verwendet, die mit Formvar/Kohle beschichtet waren. Diese wurden jeweils vor der Verwendung neu beglimmt (vgl. Standardprotokolle zur Durchführung von Negativkontrastierung am Elektronenmikroskop). Etwa 10 µl Proteinlösung (≈ 1 mg/ml) wurden auf das Netzchen

gegeben. Der Teil, der nach 1 min noch nicht an das Trägermaterial adsorbiert war, wurde entfernt. Anschließend wurde die proteinhaltige Schicht mehrmals abwechselnd mit Uranylacetatlösung (2 % in Wasser) und bidest. Wasser benetzt. Der letzte Tropfen Uranylacetat wurde ca. 30 sec auf dem Präparat belassen. Abschließend wurde das Trägernetzchen mit Filterpapier getrocknet und in die Trägerapparatur des Elektronenmikroskops eingesetzt (Transmissions-Elektronenmikroskop JEM-100CX, Jeol, Japan). Negativkontrastierungen zeigten hohle, sphärische Partikel mit einem Außendurchmesser von ca. 15 nm und einem Innendurchmesser von ca. 5 nm.

R) Die Western-Blot Analyse wurde nach der Methode von Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Ausgehend von einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel (16 %) erfolgte die Übertragung der denaturierten Proteine über einen Zeitraum von 2 Stunden bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA. Nach erfolgter Transformation der Proteine auf die Membran, wurde diese kurz in Antikörper-Waschpuffer-A (20 mM Tris, pH 7,4; 150 mM NaCl; 3 mM KCl; 0,05 % Tween 20) gewaschen und anschließend in Antikörper-Waschpuffer-B (mit 3 % Milchpulver) 1 Stunde inkubiert. Danach wurde die Membran übernacht mit 10 µl Anti-sRFS (Kaninchen Rohserum mit polyklonalen Antikörpern gegen die Lumazinsynthase; 1:10 verdünnt in 1 mg/l BSA) in einem Gesamtvolumen von 5 ml Antikörper-Waschpuffer-C (mit 1 % Milchpulver) geschwenkt. Nach der Inkubation wurde die Membran 3 x mit je 5 ml Antikörper-Waschpuffer-A gewaschen. Die gespülte Membran wurde anschließend 1 Stunde mit 20 µl Anti-Kaninchen-IgG-HRP-Konjugat (in 50 % Glycerin) in Antikörper-Waschpuffer-C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Detektion von Lumazinsynthase enthaltenden Banden via Zugabe von 3,3'-Diaminobenzidin (6 mg in 10 ml Antikörper-Waschpuffer-A) und 10 µl Wasserstoffperoxid (30 %ig). Nach Entwicklung der Membran konnte die Lumazinsynthase bei einem Molekulargewicht von ca. 16,2 kDa detektiert werden.

S) Die Reinigung der Lumazinsynthase aus dem Stamm XL1-pNCO-BS-LuSy erfolgte in zwei Schritten: Der Kultivierung der *Escherichia coli* Zellen erfolgte nach K), jedoch in einem Volumen von 1 l. Zum Aufschluß wurde das gewaschene Zellpellet in 32 ml Aufschlußpuffer suspendiert und 10 min auf Eis gekühlt. Die Zellsuspension wurde dann 15 mal mit der Nadelsonde des Ultraschallgerätes (Branson-Sonifier B-12A, Branson SONIC Power Company, Dünbury, Connecticut) bei Stufe 5 behandelt. Anschließend wurde die Suspension 5 min auf Eis gekühlt. Der Vorgang wurde insgesamt 4 mal wiederholt. Die aufgeschlossenen Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert (Sorvall

SS34-Rotor; 15000 Umin⁻¹; 4°C) und der klare Überstand auf eine Anionenaustauschersäule (DEAE-Cellulose DE52; 2 x 15 cm, Whatman Ltd., Maidstone, GB) aufgetragen. Die Säule wurde zunächst mit 100 ml Puffer A (50 mM K-Phosphat, 10 mM EDTA, 10 mM Natriumsulfit, 0,02 % Natriumazid, pH 7,0) gespült und die Lumazinsynthase anschließend unter Durchführung eines Elutionsgradienten (101 ml bis 200 ml 15 % Puffer B; 201 ml bis 500 ml 18 % Puffer B; 501 ml bis 650 ml 100 % Puffer B) unter Einbeziehung von Puffer B (1M K-Phosphat, 10 mM EDTA, 10 mM Natriumsulfit, 0,02 % Natriumazid, pH 7,0) eluiert (Flußrate: 1 ml/min). Die Lumazinsynthase konnte bei ca. 250 mM K-Phosphat eluiert werden. Die Fraktionen wurden anschließend nach N) auf Lumazinsynthaseaktivität getestet. Aktive Fraktionen wurden vereinigt und gegen Puffer A in einem Verhältnis 1:1000 dialysiert (18 h, 4 °C). Das Dialysat wurde anschließend unter Verwendung einer Ultrazentrifuge konzentriert (Beckman LE 70 mit Festwinkelrotor 70Ti; 32000 Umin⁻¹, 18 h, 4 °C). Die zu ca. 75 % angereicherte konzentrierte Proteinlösung wurde auf eine mit Puffer A equiliibrierte Gelfiltrationssäule (Sephadex-G-200, 2 x 180 cm, Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgetragen und mit Puffer A eluiert (Flußrate: 0,5 ml/min). Die Lumazinsynthase eluierte kurz nach der Ausschlußgrenze. Die Fraktionen wurden anschließend nach N) auf Lumazinsynthaseaktivität getestet und anschließend unter Verwendung einer Ultrazentrifuge konzentriert (Beckman LE 70 mit Festwinkelrotor 70Ti; 32000 Umin⁻¹, 18 h, 4 °C). Die Reinheitsüberprüfung erfolgte nach M) (SDS-PAGE), wobei nur noch eine Proteinbande bei ca. 16 kDa zu beobachten war. Nach Bestimmung der enzymatischen Aktivität nach N) und der Proteinkonzentration nach O) konnte eine spezifische Aktivität von 12400 U/mg berechnet werden. Negativkontrastierungen nach P) zeigten hohle, sphärische Partikel mit einem Außendurchmesser von ca. 15 nm und einem Innendurchmesser von ca. 5 nm.

T) Zur Überprüfung der Quartärstruktur des gereinigten Proteins wurde eine native Elektrophorese unter Verwendung von 3,5 %igen Polyacrylamidflachgelen durchgeführt. 5,7 ml Acrylamidstammlösung (38,8 % (w/v) Acrylamid; 1,2 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid), 46 ml Gelpuffer (0,2 M Na-Phosphat, pH 7,2), 13 ml H₂O₂ (300 µl Ammoniumperoxodisulfatlösung (10 % (w/v) in Wasser), 65 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin) und 5 mg Bromphenolblau wurden gemischt und in einen Gelgießstand (Pharmacia Biotech, Freiburg) unter Verwendung einer Trägerfolie (GelBond® PAG Film, FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA) gegossen und über Nacht bei Raumtemperatur

polymerisiert. Auf das Gel wurden 20 μ l Proteinlösung in einer Konzentration von 0,2-1 mg/ml gegeben. Als Elektrodenpuffer wurde der Gelpuffer verwendet. Das Gel wurde bei konstant 100 mA unter Temperaturkontrolle (10 °C) entwickelt. Die Anfärbung bzw. Entfärbung erfolgte wie unter M) beschrieben. Die gereinigte Lumazinsynthase war als diskrete Bande auf dem nativen Gel zu sehen und zeigte dasselbe Laufverhalten wie eine aus Wildtyp *Bacillus subtilis* gereinigte Probe.

U) Zur Überprüfung der Quartärstruktur bzw. der Beurteilung der strukturellen Homogenität der gereinigten Lumazinsynthase wurde eine Sedimentationsanalyse an der analytischen Ultrazentrifuge (Optima XLA mit Rotor AN60 Ti, Beckman Instruments, München), durchgeführt (Laue et al., 1992). Zur Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit wurde die Lumazinsynthase bei 45000 Umin⁻¹ zentrifugiert. Alle 5 min wurde die radiale Absorptionsänderung bei 280 nm gemessen und damit der Sedimentationsverlauf des Proteins verfolgt. Rekombinante Lumazinsynthase sedimentierte als homogene, symmetrische Grenzschicht, d.h. bei der Probe handelte es sich um eine einzige Molekülspezies. Aus dem zeitlichen Sedimentationsfortschritt während der einzelnen Messungen wurde eine mittlere Sedimentationskonstante $S_{20,w}$ von 26,3 S bestimmt.

V) Die genaue Bestimmung des nativen Molekulargewichts der Lumazinsynthase und die entgültige Bestätigung des Aggregationsgrades erfolgte mit der analytischen Ultrazentrifuge nach der Sedimentationsgleichgewichtsmethode. Die radiusabhängige Konzentrationsmessung erfolgte über die Messung der Absorption bei 280 nm. Die Proben waren konzentriertes Protein (nach Sepharose-6B), das auf SDS-Polyacrylamidgelen nur noch eine einzige Bande (16,2 kDa) zeigte. Die Absorption der verwendeten Proben betrug etwa 0,3 bei 280 nm. 150 μ l Probe wurden in den Probensektor einer Meßzelle gegeben und mit 15 μ l Öl (Fluorochemical FC 43, Beckman) unterschichtet. Der Referenzsektor wurde mit 200 μ l Puffer A (siehe R)) befüllt. Die Enzymprobe wurde bei 3000 Umin⁻¹ und 4 °C solange zentrifugiert, bis sich das Gleichgewicht zwischen Zentrifugation und Rückdiffusion eingestellt hatte. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software XLA-Data-Analysis (Teilprogramm Origin-single; Beckman Instruments). Das partielle spezifische Volumen des Proteins wurde näherungsweise nach Cohn und Edsall (1943) aus den partiellen spezifischen Volumina der Aminosäuren und Addition einer Temperaturkorrektur errechnet. Für die Lumazinsynthase wurde eine Molekülmasse von 925 kDa bei 4 °C erhalten und damit die Aggregation zu einem 60-mer bestätigt.

Beispiel 2**Homologe Expression der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* im *Bacillus subtilis* Stamm BR151-pBL1**

Im Vergleich zur heterologen Expression in *Escherichia coli* kann bei der homologen Expression in *Bacillus subtilis* eine höhere Ausbeute an Lumazinsynthase erzielt werden.

A) Analog Beispiel 1 A) - E), wobei anstelle des Oligonukleotids EcoRI-RBS-1 Oligonukleotid EcoRI-RBS-2 (5' ata ata gaa ttc att aaa gag gag aaa tta act atg 3') verwendet wurde.

B) Der Expressionsvektor p602/-CAT wurde analog Beispiel 1 F) verdaut. Das entstandene DNA-Fragment mit einer Länge von 5269 bp wie unter Beispiel 1 B) beschrieben gereinigt und zur Ligation eingesetzt.

C) Die Ligation erfolgte analog Beispiel 1 G), wobei das Expressionsplasmid p602-BS-LuSy erhalten wurde.

D) Die Transformation von *Escherichia coli* XL1-Zellen erfolgte analog Beispiel 1 H), jedoch wurden anstelle LB-AMP-Platten, LB-KAN-Selektivagarplatten (21 g/l Agar; 10 g/l Caseinhydrolysat; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; 15 mg/l Kanamycin) verwendet, da der Vektor p602/-CAT über eine Kanamycin-Resistenz anstelle der Ampicillin-Resistenz verfügt.

E) Die Isolierung der Expressionsplasmide erfolgte analog Beispiel 1 I), jedoch wurden die Zellen auf LB-KAN-Flüssigmedium (10 g/l Caseinhydrolysat; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; 15 mg/l Kanamycin) angezogen.

F) Die Sequenzierung erfolgte analog Beispiel 1 J) jedoch mit Sequenzieroligonukleotid Seq-2 (5' gta taa tag att caa att gtg agc gg 3').

G) Die Kultivierung der Expressionsstämme erfolgte analog Beispiel 1 K), jedoch unter Verwendung von LB-KAN-Flüssigmedium.

H) Der Aufschluß der Zellen wurde analog Beispiel 1 L) durchgeführt.

I) Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese des *Escherichia coli* Stammes XL1-p602-BS-LuSy (durchgeführt gemäß Beispiel 1 M)) zeigte eine diskrete Proteinbande bei ca. 16 kDa, die einer Expressionsrate von ca. 30 % bezogen auf die gesamte lösliche Proteinfraktion entsprach.

J) Die Überprüfung der Funktionalität gemäß Beispiel 1 N) und der Gesamtproteinkonzentration gemäß Beispiel 1 O) ergab eine spezifische Aktivität von ca. 3700 U/mg.

K) Die Herstellung elektrokompetenter *Bacillus subtilis* Zellen erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von Brigidi et al. (1989). 500 ml LB-ERY-Flüssigmedium (10 g/l Caseinhydrolysat; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; 15 mg/l Erythromycin) wurden 1:100 mit einer *Bacillus subtilis* Zellen (BR151[pBL1]) enthaltenden Übernacht-Kultur angeimpft und bei 32 °C bis zu einer optischen Dichte (578 nm) von 0,6 bebrühtet. Zum Abstoppen des Zellwachstums wurden die Zellen 30 min auf Eis gestellt und anschließend zur Gewinnung der Zellmasse zentrifugiert (Sorvall-GSA-Rotor, 2300 Umin⁻¹, 4 °C, 15 min). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit 300 ml eiskaltem, steriles 1 mM HEPES-Puffer (1 mM (N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure in Wasser, pH 7,0) gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal in je 200 ml PEB-Puffer (272 mM Saccharose; 1 mM MgCl₂; 7 mM K-Phosphat, pH 7,4) gewaschen und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde abschließend in 16 ml PEB-Puffer suspendiert und auf Eis gekühlt. Elektroporationszelle und Zellenhalter wurden 15 min auf Eis vorgekühlt. 800 µl Zellsuspension wurde in einem vorgekühlten Eppendorf-Gefäß mit 500-1500 ng Plasmid-DNA (p602-BS-LuSy aus E)) vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Überführung der inkubierten Suspension in die Elektroporationszelle (4 mm) wurde die Elektroporation bei 25 µF und 2,5 kV in einer Elektroporationsapparatur (Gene Pulse, BioRad, München) durchgeführt. Anschließend wurde die Zellsuspension für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Zur Expression des Phänotyps (Kanamycin-Resistenz) wurden die transformierten Zellen in 6 ml LB-ERY-Medium (s.o.) pipettiert und 2 h bei 32 °C bebrühtet. Anschließend wurden 25 ml LB-ERY-KAN-Medium (10 g/l Caseinhydrolysat; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; 15 mg/l Erythromycin; 15 mg/ml Kanamycin) mit 1 ml des Transformationsansatzes beimpft und für 4-8 h bei 32 °C im Schüttelinkubator bebrühtet. Parallel dazu wurden Portionen von 100 µl, 200 µl und 400 µl des Transformationsansatzes direkt auf LB-ERY-KAN-Selektivagarplatten (21 g/l Agar; 10 g/l Caseinhydrolysat; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; 15 mg/l Erythromycin; 15 mg/ml Kanamycin) ausplattiert. Portionen der Flüssigkultur wurden nach 2, 4, 6 und 8 h auf LB-ERY-KAN-Platten ausplattiert.

L) Die erhaltenen *Bacillus subtilis* Stämme BR151-pBL1-p602-BS-LuSy wurden unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion auf Anwesenheit des Expressionsplasmides getestet. Zur Analytik der Transformanden wurden jeweils PCR-Ansätze (vgl. Beispiel 1 A) jedoch ohne Matrizen-DNA und entsprechend mehr Wasser) vorgelegt und darin unter Verwendung von sterilen Zahnstochern frisches Zellmaterial (von den erhaltenen Kolonien) suspendiert. Nach erfolgter Suspendierung wurde eine Kopie der jeweiligen

Transformande auf einer LB-ERY-KAN-Selektivagarplatte angelegt. Bei allen getesteten Kolonien wurde ein DNA-Fragment mit einer Länge von 498 bp erhalten.

M) Die Kultivierung der Zellen erfolgte auf LB-ERY-KAN-Flüssigmedium (10 g/l Caseinhydrolysat; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; 15 mg/l Erythromycin; 15 mg/ml Kanamycin) gemäß Beispiel 1 K), jedoch wurde die Fermentation bei 32 °C durchgeführt und die Wachstumsphase nach Induktion mit IPTG betrug 18 h.

N) Der Aufschluß der Zellen erfolgte analog Beispiel 1 L).

O) Die Überprüfung der Expressionsrate anhand einer SDS-Polyacrylamidgelektrophorese erfolgte analog Beispiel 1 M) und ergab eine Expressionsrate von ca. 40 -50 % bezogen auf die gesamte lösliche Proteinfaktion.

P) Die Überprüfung der Funktionalität bzw. der Proteinkonzentration wurde gemäß Beispiel 1 N) und O) durchgeführt. Im Rohextrakt des Expressionsstammes BR151-pBL1-p602-BS-LuSy konnte eine spezifische Aktivität von 4000 U/mg gemessen werden.

Q) Die Durchführung der Negativkontrastierung erfolgte nach Beispiel 1 P), wobei hohle, sphärische Partikel mit einem Außendurchmesser von ca. 15 nm und einem Innendurchmesser von ca. 5 nm zu beobachten waren.

R) Die Western-Blot-Analyse wurde nach Beispiel 1 Q) durchgeführt und ergab ein vergleichbares Ergebnis.

S) Da die Expressionsrate im verwendeten *Bacillus subtilis* Stamm BR151-pBL1-p602-BS-LuSy deutlich höher lag als im *Escherichia coli* Stamm XL1-pNCO-BS-LuSy konnte die Reinigung mit einer einzigen Säule (Sepharose-6B, 2 x 180 cm, Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt werden. Die Kultivierung der Zellen erfolgte nach M), jedoch in einem Volumen von 1l. Der Aufschluß erfolgte nach Beispiel 1 R) in 32 ml Aufschlußpuffer, jedoch wurden dem Aufschlußpuffer 30 mg Lysozym zugesetzt. Es erfolgte zunächst eine Inkubation der Zellsuspension (37 °C, 60 min) an die sich der Ultraschall-Aufschluß gemäß Beispiel 1 R) anschloß. Die aufgeschlossenen Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert (Sorvall SS34-Rotor; 15000 Umin⁻¹; 4°C), filtriert (Porenweite 0,22 µm) und der klare Überstand auf eine mit Puffer A (gemäß Beispiel 1 R)) equilierte Gelfiltrationssäule aufgetragen und mit Puffer A eluiert (Flußrate: 0,5 ml/min). Die Lumazinsynthase wurde vom Säulenmaterial nicht retardiert. Die Fraktionen wurden anschließend nach Beispiel 1 N) auf Lumazinsynthaseaktivität getestet und anschließend unter Verwendung einer Ultrazentrifuge konzentriert (Beckman LE 70 mit Festwinkelrotor 70Ti; 32000 Umin⁻¹, 18 h, 4 °C). Die Reinheitsüberprüfung erfolgte nach Beispiel 1 M) (SDS-PAGE), wobei nur eine Pro-

teinhande bei ca. 16 kDa zu beobachten war. Nach Bestimmung der enzymatischen Aktivität und der Proteinkonzentration (gemäß Beispiel 1 N) und O)) konnte eine spezifische Aktivität von 12400 U/mg berechnet werden. Negativkontrastierungen (gemäß Beispiel 1 P)) zeigten hohle, sphärische Partikel mit einem Außendurchmesser von ca. 15 nm und einem Innendurchmesser von ca. 5 nm.

T) Die Überprüfung der Quartärstruktur der gereinigten Lumazinsynthase erfolgte gemäß Beispiel 1 S) bis U) und ergab ein vergleichbares Ergebnis.

Beispiel 3

Ersatz der Aminosäure Cystein an der Positionen 93 durch die Aminosäure Serin in der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*

A) Das Gen für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* wurde mit den Oligonukleotiden PNCO-M2 (5' aga tat ttt cat taa aga gga gaa 3'), welches am 3'-Ende an einen Teil der ribosomalen Bindungsstelle bindet und am 5'-Ende einen nicht bindenden Sequenzabschnitt zur Deletion der vektoriellen EcoRI-Schnittstelle enthält und RibH-3 (5' tat tat gga tcc tta ttc aaa tga gcg gtt taa att tg 3') aus dem Plasmid pNCO-BS-LuSy (Beispiel 1) amplifiziert.

10 µl PCR-Puffer

6 µl Mg²⁺ [1,5 mM]

8 µl dNTP's [je 200 µM]

1 µl PNCO-M2 [0,5 µM]

1 µl RibH-3 [0,5 µM]

1 µl pNCO-BS-LuSy [10 ng]

1 µl Goldstar-Taq-Polymerase [0,5 U] (Eurogentec, Seraing, Belgien)

72 µl H₂O_{bdest}

Der Ansatz wurde im Thermocycler (GeneAmp[®] PCR System 2400; Perkin Elmer) bei folgenden Bedingungen durchgeführt: 1. 5,0 min 95 °C

2. 0,5 min 94 °C

3. 0,5 min 50 °C

4. 0,5 min 72 °C

5. 7,0 min 72 °C

6. abkühlen auf 4 °C

Die Schritte 2. - 4. wurden 20 x wiederholt.

B) Der PCR-Ansatz wurde gemäß Beispiel 1 B) gereinigt, wobei ein Fragment mit 505 bp erhalten wurde.

C) Ein Teil des Gens für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* wurde mit den Oligonukleotiden PNCO-M1 (5' gtg agc gga taa caa ttt cac aca g 3'), welches im Bereich der EcoRI-Schnittstelle im Expressionsvektor bindet und diese Erkennungssequenz unberührt lässt und C93S (5' gca gct tca *ttc gaa* aca taa tcg taa tg 3'), welches die Mutation und die Schnittstelle *BstBI* (aminoäurenkonservativ) zur Detektion der Mutation einführt, aus dem Plasmid pNCO-BS-LuSy (Beispiel 1) amplifiziert. Die Durchführung der PCR und die Reinigung des Fragmentes (256 bp) erfolgte analog A) und B).

D) Verlängerung des DNA-Fragmentes (256 bp) aus C) durch Kombination mit DNA-Fragment (505 bp, repräsentiert die gesamte Genlänge) aus B) und Durchführung einer PCR. Bei diesem PCR-Ansatz dienen die eingesetzten PCR-Fragmente aus B) und C) selbst als Primer für die Polymerasereaktion. Um eine effiziente Verlängerung zu erreichen wurden beide Fragmente in äquimolaren Mengen (je 500 fmol) eingesetzt.

10 µl Puffer
6 µl Mg²⁺ [1,5 mM]
8 µl dNTP's [je 200 µM]
1 µl DNA-Fragment aus B) (500 fmol)
1 µl DNA-Fragment aus C) (500 fmol)
1 µl Goldstar-Taq-Polymerase [0,5 U]
73 µl H₂O_{bdest}

Der Ansatz wurde im Thermocycler (GeneAmp[®] PCR System 2400; Perkin Elmer) bei folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. 5,0 min 95 °C
2. 0,5 min 94 °C
3. 0,5 min 65 °C
4. 0,5 min 72 °C
5. 7,0 min 72 °C
6. abkühlen auf 4 °C

Die Schritte 2. - 4. wurden 20 x wiederholt.

E) Eine ungereinigte Portion des PCR-Ansatzes aus D) diente als DNA-Matrize für einen PCR-Ansatz mit der Primerkombination PNCO-M1/RibH-3. Der PCR-Ansatz wurde gemäß A) durchgeführt, wobei jedoch die PCR-Schritte 25 x wiederholt wurden.

F) Der PCR-Ansatz wurde gemäß Beispiel 1 B) gereinigt, wobei ein Fragment mit 528 bp erhalten wurde.

G) Die Weiterverarbeitung erfolgte gemäß Beispiel 1 E) bis I). Die eingeführte Mutation wurde durch Verdaul des Plasmids pNCO-BS-LuSy-C93S mit der Restriktionsendonuklease BstBI (TT*CGAA) diagnostiziert (Fragmente mit 3698 bp und 181 bp).

H) Die Sequenzierung erfolgte gemäß Beispiel 1 J).

I) Proteinchemische Arbeiten wurden gemäß Beispiel 1 K) bis S) durchgeführt, wobei kein signifikanter Unterschied zur Wildtyp-Lumazinsynthase erkennbar wurde.

Beispiel 4

Ersatz der Aminosäure Cystein an der Positionen 139 durch die Aminosäure Serin in der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*

A) Das Gen für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* wurde analog Beispiel 3 A) mit den Oligonukleotiden PNCO-M2 und RibH-3 aus dem Plasmid pNCO-BS-LuSy (Beispiel 1) amplifiziert und gereinigt.

B) Ein Teil des Gens für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* wurde analog Beispiel 3 B) mit den Oligonukleotiden PNCO-M1 und C139S (5' ggc aga aac agc tga atc tac acc ttt gtt g 3'), welches die Mutation und die Schnittstelle PvuII (aminosäurenkonservativ) zur Detektion der Mutation einführt, aus dem Plasmid pNCO-BS-LuSy (Beispiel 1) amplifiziert. Die Durchführung der PCR und die Reinigung des Fragmentes (394 bp) erfolgte analog Beispiel 3 A) und B).

C) Das weitere molekularbiologische Vorgehen entsprach Beispiel 3 D) bis H). Die eingeführte Mutation wurde durch Verdaul des Plasmids pNCO-BS-LuSy-C139S mit der Restriktionsendonuklease PvuII (CAG*CTG) diagnostiziert (Fragmente mit 3539 bp und 340 bp).

D) Das weitere biochemische Vorgehen entsprach Beispiel 1 K) bis S) wobei kein signifikanter Unterschied zur Wildtyp-Lumazinsynthase erkennbar wurde.

Beispiel 5

Ersatz der Aminosäure Cystein an den Positionen 93 und 139 durch die Aminosäure Serin in der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*

A) Der Herstellung der Doppelmutante pNCO-BS-LuSy-C93/139S erfolgte analog zu Beispiel 4, jedoch wurde als DNA-Matrize das Plasmid pNCO-BS-LuSy-C93S verwendet.

B) Nach erfolgter biochemischer Charakterisierung (gemäß Beispiel 1 K) bis S)) konnte kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp-Enzym festgestellt werden.

Konstruktion von Expressionsvektoren zur N-terminalen und C-terminalen Fusion von Fremdproteinen an die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*

Die folgenden Beispiele beschreiben die Herstellung von *Escherichia coli* Expressionsvektoren zur Fusion von Genen oder synthetisch hergestellter DNA-Fragmenten an das 5'-Ende bzw. an das 3'-Ende des Gens für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*. Die Vektoren enthalten die erfindungsgemäß bevorzugten Vektorelemente, wie Promotor aus dem Bakteriophagen T5, eine lac-Operatorsequenz, einen Ampicillinresistenzmarker und einen zu *Escherichia coli* kompatiblen Replikationsursprung.

Beispiel 6**Vektor zur Fusion von Fremd-DNA an das 5'-Ende des Gens für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis***

A) Das Gen für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* wurde mit den Oligonukleotiden N1 (5' act atg gcg gcg gcg cgt agc tgc gcg gcc gct atg aat atc ata caa gga aat tta g 3'), welches eine NotI-Schnittstelle unmittelbar vor dem Startcodon erzeugt und RibH-4 (3' tat tat gga tcc aaa tta ttc aaa tga gcg gtt taa att tg 3') aus dem Plasmid pRF2 (siehe Beispiel 1) amplifiziert. Die PCR wurde analog Beispiel 1 A) durchgeführt.

B) Die Reinigung erfolgte analog Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit 513 bp erhalten wurde.

C) 10 ng der isolierten DNA aus B) dienten anschließend als Matrize für eine 2. PCR mit den Oligonukleotiden N2 (5' ata ata gaa ttc att aaa gag gag aaa tta act atg gcg gcg gcg cgt agc tgc 3'), welches in 5'-Richtung eine ribosomale Bindungsstelle und eine Erkennungssequenz für die Endonuklease EcoRI einführt, und RibH-4.

D) Die weitere Vorgehensweise erfolgte analog Beispiel 1 B), E) bis J). Es wird das Plasmid pNCO-N-BS-LuSy erhalten.

Beispiel 7**Vektor zur Fusion von Fremd-DNA an das 3'-Ende des Gens für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis***

A) Das Gen für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* wurde mit den Oligonukleotiden EcoRI-RBS-2 (vgl. Beispiel 2 A)) und C2 (5' ttt tcg gga tcc ttt taa act gtt tgc ggc cgc taa ttc aaa tga gcg gtt taa att tg 3'), welches eine NotI-Schnittstelle hinter dem letzten kodierenden Basentriplett des Gens für die Lumazinsynthase und in 3'-Richtung eine BamHI-Schnittstelle im Abstand von 13 Nukleotiden einführt, aus dem Plasmid pNCO-BS-LuSy (vgl. Beispiel 1) amplifiziert. Das ehemalige Stopcodon des Lumazinsynthase-Gens wird durch das für die Aminosäure Leucin kodierende Basentriplett TTA ersetzt.

B) Die weitere Vorgehensweise erfolgte analog Beispiel 1 B), E) bis J). Es wird das Plasmid pNCO-C-BS-LuSy erhalten.

Fusion von vollständigen Proteinen an den N-Terminus bzw. an den C-Terminus der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*

Die folgenden Beispiele beschreiben die Fusion eines intakten vollständigen Gens an das 5'-Ende bzw. an das 3'-Ende des Gens für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*. Die Beispiele illustrieren die Durchführbarkeit der Fusion von vollständigen, biologisch aktiven Proteinen an den N-Terminus als auch an den C-Terminus der ikosaedrischen Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*.

Beispiel 8**Fusion der Dihydrofolatreduktase aus *Escherichia coli* an den N-Terminus der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis***

A) Das Gen für die Dihydrofolatreduktase (DHFR) wurde mittels PCR aus isolierter chromosomal-DNA (*Escherichia coli* RR28) unter Verwendung der Oligonukleotide EC-DHFR-1 (5' gag gag aaa tta act atg atc agt ctg att gcg g 3'), welches am 3'-Ende zum 5'-Ende des DHFR-Gens komplementär ist und am 5'-Ende für einen Teil einer optimierten ribosomalen Bindungsstelle kodiert. und EC-DHFR-2 (5' cta gcc gta aat tct ata gcg gcc gca cgc cgc tcc aga atc 3'). welches am 3'-Ende zum Gen der DHFR komplementär ist und unmittelbar hinter dem letzten codierenden Basentriplett eine Erkennungssequenz für die Endonuklease NotI einführt, amplifiziert. Die Durchführung der PCR erfolgte analog Beispiel 1 A). wobei ca. 50 ng chromosomale DNA eingesetzt wurde.

B) Die Reinigung des PCR-Ansatzes erfolgte gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 513 bp erhalten wurde.

C) Die Durchführung einer zweiten PCR erfolgte analog Beispiel 1 C), wobei jedoch die Oligonukleotid-Kombination BS-MfeI (5' ata ata *caa ttg* att aaa gag gag aaa tta act atg 3'). welches die ribosomale Bindungsstelle vervollständigt und unmittelbar vor der ribosomalen Bindungsstelle eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease MfeI in das DNA-Fragment einführt, und EC-DHFR-2 verwendet wurde.

D) Der PCR-Ansatz wurde wie unter Beispiel 1 B) beschrieben gereinigt, wobei ein Fragment mit einer Länge von 531 bp erhalten wurde.

E) Das isolierte DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen MfeI verdaut.

30,0 µl Fragment aus der 2. PCR

5,0 µl MfeI [50 U]

10,0 µl Puffer 4 (10 x; 50 mM K-Aacetat, 20 mM Tris-Aacetat, 10 mM Mg-Aacetat, 1 mM Dithiothreitol, pH 7,9)

55,0 µl H₂O_{bidest}

Das Restriktionsenzym wurde von der Firma New England Biolabs (Schwalbach) bezogen. Der Ansatz wurde 150 min bei 37 °C inkubiert und wie unter Beispiel 1 B) beschrieben gereinigt und zum Verdau mit der Restriktionsendonuklease NotI eingesetzt.

F) Das gereinigte DNA-Fragment aus E) wurde mit der Restriktionsendonuklease NotI verdaut.

30,0 µl Fragment aus E)

5,0 µl NotI [50 U]

10,0 µl Puffer 3 (10 x; 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol, pH 7,9)

55,0 µl H₂O_{bidest}

Das Restriktionsenzym wurde von der Firma New England Biolabs (Schwalbach) bezogen. Der Ansatz wurde 150 min bei 37 °C inkubiert und wie unter Beispiel 1 B) beschrieben gereinigt und zur Ligation eingesetzt.

G) 5 µg des Expressionsvektors pNCO-N-BS-LuSy in einem Volumen von 30 µl wurden zunächst mit der Restriktionsendonuklease NotI analog F) verdaut und gemäß Beispiel 1 B) gereinigt.

H) Das Vektorfragment aus G) wurde anschließend mit der Restriktionsendonuklease EcoRI verdaut.

30,0 μ l Vektor-Fragment aus G

2,5 μ l EcoRI [62,5 U]

20,0 μ l OPAU (10 x: 500 mM K-Aacetat, 100 mM Mg-Aacetat, 100 mM Tris-Aacetat pH 7,5)

47,5 μ l H₂O_{büdest}

Der Ansatz wurde ebenfalls 150 min bei 37 °C inkubiert und das entstandene DNA-Fragment mit einer Länge von 3863 bp wie unter Beispiel 1 B) beschrieben gereinigt und zur Ligation eingesetzt.

- I) Das weitere Vorgehen erfolgte gemäß Beispiel 1 G) bis L).
- J) Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde gemäß Beispiel 1 M) durchgeführt. Im Rohextrakt des Stammes XL1-pNCO-EC-DHFR-BS-LuSy konnte eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 34,5 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne pNCO-EC-DHFR-BS-LuSy-Expressionsplasmid nicht zu sehen war. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca. 40-50 % bezogen auf alle löslichen Proteine (geschätzt).
- K) Die Überprüfung der Funktionalität der 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazinsynthase erfolgte gemäß Beispiel 1 N) in Verbindung mit O). Im Rohextrakt konnte kein signifikanter Unterschied zu einer nicht-derivatisierten Wildtyp-Lumazinsynthase beobachtet werden.
- L) Die Reinigung erfolgte gemäß Beispiel 2 S) an einer Sepharose-6B-Gelfiltrationssäule, wobei die Konzentrierung der Proteinfraktionen bei 28000 Umin⁻¹ durchgeführt wurde. Negativkontrastierung gemäß Beispiel 1 P) zeigten hohle, sphärische Partikel mit einem Außen-durchmesser von ca. 20 nm und einem Innendurchmesser von ca. 5 nm.
- M) Die Überprüfung der Quartärstruktur erfolgte gemäß Beispiel 1 S). Im Vergleich zur Wildtyp-Lumazinsynthase konnte ein deutlicher Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit (EC-DHFR-BS-LuSy wanderte deutlich langsamer, bildete aber auch eine diskrete Bande) beobachtet werden.

Beispiel 9

Fusion des 'Maltose-bindenden-Proteins' aus *Escherichia coli* an den N-Terminus der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*

- A) Das Gen für das „Maltose-bindene-Protein“ (MBP) wurde mittels PCR aus dem Plasmid pMAL-C2 (New England Biolabs, Schwalbach) unter Verwendung der Oligonukleotide MALE-1 (5' gag gag aaa tta act atg aaa atc gaa gaa ggt aaa c 3'), welches am 3'-Ende zum 5'-Ende des MBP-Gens komplementär ist und am 5'-Ende für einen Teil einer optimierten

ribosomalen Bindungsstelle kodiert, und MALE-2 (5' gca ggt cga ctc tag cgg ccg cga att ctg 3'), welches am 3'-Ende zum Gen des MBP komplementär ist und unmittelbar hinter dem letzten codierenden Basentriplett eine Erkennungssequenz für die Endonuklease *NotI* einführt, amplifiziert. Die Durchführung der PCR erfolgte analog Beispiel 1 A), wobei ca. 10 ng Plasmid-DNA eingesetzt wurde.

B) Die Reinigung des PCR-Ansatzes erfolgte gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 1210 bp erhalten wurde.

C) Die Durchführung einer zweiten PCR erfolgte analog Beispiel 1 C), wobei jedoch die Oligonukleotid-Kombination BS-MfeI (5' ata ata caa ttg att aaa gag gag aaa tta act atg 3'), welches die ribosomale Bindungsstelle vervollständigt und unmittelbar vor der ribosomalen Bindungsstelle eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *MfeI* in das DNA-Fragment einführt, und MALE-2 verwendet wurde.

D) Der PCR-Ansatz wurde wie unter Beispiel 1 B) beschrieben gereinigt, wobei ein Fragment mit einer Länge von 1227 bp erhalten wurde.

E) Das weitere Vorgehen erfolgte gemäß Beispiel 8 E) bis I).

F) Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde gemäß Beispiel 1 M) durchgeführt. Im Rohextrakt des Stammes XL1-pNCO-EC-MBP-BS-LuSy konnte eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 59,5 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne pNCO-EC-MBP-BS-LuSy-Expressionsplasmid nicht zu sehen war. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca. 50 % bezogen auf alle löslichen Proteine (geschätzt).

G) Die Überprüfung der Funktionalität der 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazinsynthase erfolgte gemäß Beispiel 1 N) in Verbindung mit O). Im Rohextrakt konnte kein signifikanter Unterschied zu einer nicht-derivatisierten Wildtyp-Lumazinsynthase beobachtet werden.

H) Die Reinigung erfolgte gemäß Beispiel 2 S) an einer Sepharose-6B-Gelfiltrationssäule, wobei die Konzentrierung der Proteinfraktionen bei 28000 Umin⁻¹ durchgeführt wurde. Negativkontrastierung gemäß Beispiel 1 P) zeigten hohle, sphärische Partikel mit einem Außendurchmesser von ca. 25 nm und einem Innendurchmesser von ca. 5 nm.

I) Die Überprüfung der Quartärstruktur erfolgte gemäß Beispiel 1 S). Im Vergleich zur BS-LuSy und EC-DHFR-BS-LuSy konnte ein deutlicher Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit (EC-MBP-BS-LuSy wanderte deutlich langsamer als BS-LuSy und EC-DHFR-BS-LuSy, bildete aber auch eine diskrete Bande) beobachtet werden.

Beispiel 10**Fusion der Dihydrofolatreduktase aus *Escherichia coli* an den C-Terminus der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis***

A) Das Gen für die Dihydrofolatreduktase (DHFR) wurde mittels PCR aus isolierter chromosomal-DNA (*Escherichia coli* RR28) unter Verwendung der Oligonukleotide Oligonukleotide EC-FolA-1 (5' ata gtg gcg aca atg cgg ccg ctg gtg gag gcg gaa tga tca gtc tga ttg cgg cg 3'), welches am 3'-Ende zum 5'-Ende des DHFR-Gens komplementär ist und am 5'-Ende unmittelbar vor dem Startcodon des DHFR-Gens eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *NotI* einführt und EC-FolA-2 (5' ttc tat gga tcc tta ccg ccg ctc cag aat c 3'), welches am 3'-Ende zum Gen der DHFR komplementär ist und unmittelbar hinter dem Stopcodon eine Erkennungssequenz für die Endonuklease *BamHI* einführt, amplifiziert. Die Durchführung der PCR erfolgte analog Beispiel 1 A), wobei ca. 50 ng chromosomal DNA eingesetzt wurde.

B) Die Reinigung des PCR-Ansatzes erfolgte gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 524 bp erhalten wurde.

C) Das isolierte DNA-Fragment wurde mit der Restriktionsendonukleasen *BamHI* verdaut.

30,0 µl Fragment aus der 2.PCR

3,0 µl *BamHI* [60 U]

20,0 µl OPAU (10x)

47,0 µl H₂O_{bidest}

Das Restriktionsenzym wurde von der Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen. Der Ansatz wurde 150 min bei 37 °C inkubiert und wie unter Beispiel 1 B) beschrieben gereinigt und zum Verdau mit der Restriktionsendonuklease *NotI* eingesetzt.

D) Das gereinigte DNA-Fragment aus C) wurde mit der Restriktionsendonuklease *NotI* gemäß Beispiel 8 F) verdaut und wie unter Beispiel 1 B) beschrieben gereinigt und zur Ligation eingesetzt.

E) 5 µg des Expressionsvektors pNCO-C-BS-LuSy in einem Volumen von 30 µl wurden zunächst gemäß C) und D) verdaut, wobei ein Fragment mit einer Länge von 3880 bp entstanden ist, gemäß Beispiel 1 B) gereinigt, und zur Ligation eingesetzt.

I) Das weitere Vorgehen erfolgte gemäß Beispiel 1 G) bis L).

J) Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde gemäß Beispiel 1 M) durchgeführt. Im Rohextrakt des Stammes XL1-pNCO-BS-LuSy-EC-DHFR konnte eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 34,8 kDa beobachtet werden, die in einem Ver-

gleichsstamm ohne pNCO-BS-LuSy-EC-DHFR-Expressionsplasmid nicht zu sehen war. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca. 25 % bezogen auf alle löslichen Proteine (geschätzt).

K) Die Überprüfung der Funktionalität der 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazinsynthase erfolgte gemäß Beispiel 1 N) in Verbindung mit O). Im Rohextrakt konnte kein signifikanter Unterschied zu einer nicht-derivatisierten Wildtyp-Lumazinsynthase beobachtet werden.

L) Die Überprüfung der Quartärstruktur erfolgte gemäß Beispiel 1 S). Im Vergleich zur Wildtyp-Lumazinsynthase konnte ein deutlicher Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit (EC-DHFR-BS-LuSy wanderte deutlich langsamer, bildete aber auch eine diskrete Bande) beobachtet werden.

Kopplung eines 17 Aminosäuren langen Epitops des VP2 Oberflächenproteins eines Säugetievirus an den N-Terminus, an den C-Terminus und an beide Termini der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*

Die folgenden Beispiele beschreiben die Fusion von kurzen Peptiden an beide Termini der ikosaedrischen Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* unter Erhalt der sphärischen Struktur. Durch die gleichzeitige Belegung beider Termini wird eine 120-fache Belegung der Oberfläche des Ikosaeders ermöglicht.

Das 17 Aminosäuren lange Peptid zählt zu den hochkonservierten Bereichen des VP2 Oberflächenproteins von verschiedenen tierischen Virusarten, wie z.B. des 'Mink enteritis Virus', des 'Feline panleukopeniavirus' oder des 'Canine Parvovirus'.

Beispiel 11

Fusion der VP2-Domäne an den N-Terminus der Lumazinsynthase

A) Das Gen für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* wurde zunächst mit den Oligonukleotiden N-VP2-1 (5' ggt cag ccg gct gtt cgt aac gaa cgt atg aat atc ata caa gga aat tta gtt ggt ac 3'), welches an seinem 3'-Ende komplementär zum 5'-Ende des Lumazinsynthasegens und am 3'-Ende für einen Teil der VP2-Domäne kodiert und RibH-3 (siehe Beispiel 3 A)) aus dem Plasmid pRF2 (siehe Beispiel 1 A)) amplifiziert. Die Durchführung der PCR erfolgte gemäß Beispiel 1 A).

B) Der PCR-Ansatz wurde gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 504 bp erhalten wurde, gereinigt und als DNA-Matrize für eine 2. PCR eingesetzt.

C) Die Durchführung der 2. PCR erfolgte analog Beispiel 1 C), wobei jedoch die Oligonukleotid-Kombination N-VP2-2 (5' gag gag aaa tta act atg ggg gac ggt gct gtt cag ccg gac ggt ggt cag ccg gct gtt cgt aac gaa cg 3'), welches an seinem 3'-Ende komplementär zu dem schon eingeführten Teil der VP2-Domäne ist, die VP2-Domäne vervollständigt, ein ATG-Startcodon und einen Teil einer optimierten ribosomalen Bindungsstelle unmittelbar vor der VP2-Sequenz einführt, und RibH-3 verwendet wurden.

D) Der PCR-Ansatz aus C) wurde analog Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 549 bp erhalten wurde, gereinigt und als DNA-Matrize für eine 3. PCR eingesetzt.

E) Die Durchführung der 3. PCR erfolgte analog Beispiel 1 C), jedoch mit den Oligonukleotiden EcoRI-RBS-2 (siehe Beispiel 2 A)) und RibH-3.

F) Der PCR-Ansatz aus E) wurde analog Beispiel 1 B) gereinigt und ein DNA-Fragment mit einer Länge von 567 bp erhalten.

G) Die weitere Verarbeitung erfolgte analog Beispiel 1 E) bis L), wobei der *Escherichia coli* Expressionsstamm XL1-pNCO-N-VP2-BS-LuSy erhalten wurde.

H) Die Überprüfung der Expressionsrate bzw. der Größe des monomeren Proteinstranges wurde analog Beispiel 1 M) durchgeführt. Im Rohextrakt des Stammes XL1-pNCO-N-VP2-BS-LuSy konnte eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 18,2 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne pNCO-N-VP2-BS-LuSy-Expressionsplasmid nicht zu sehen war. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca.

I) 10 % bezogen auf alle löslichen Proteine (geschätzt).

J) Nach Überprüfung der Funktionalität gemäß Beispiel 1 N) bis Q) konnte kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp-Enzym beobachtet werden.

Beispiel 12

Fusion der VP2-Domäne an den C-Terminus der Lumazinsynthase

A) Das Gen für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* wurde zunächst mit den Oligonukleotiden RibH-1 (siehe Beispiel 1 A)) und C-VP2-1 (5' cca ccg tcc ggc tga aca gca ccg tca cct tcg aaa gaa cgg ttt aag ttt gcc 3'), welches an seinem 3'-Ende komplementär zum Gen für die Lumazinsynthase ist und unmittelbar hinter dem letzten kodierenden Basentriplett der Lumazinsynthase einen Teil der VP2-Domäne einführt, aus dem Plasmid pRF2 (siehe Beispiel 1 A)) amplifiziert.

B) Der PCR-Ansatz wurde gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 506 bp erhalten wurde, gereinigt und als DNA-Matrize für eine 2. PCR eingesetzt.

C) Die Durchführung der 2. PCR erfolgte analog Beispiel 1 C), wobei jedoch die Oligonukleotid-Kombination EcoRI-RBS-2 (siehe Beispiel 2 A)) und C-VP2-2 (5' ata tat gga tcc taa cgt tcg tta cga aca gcc ggc tga cca ccg tcc ggc tga aca gca ccg tc 3'), welches die VP2-Domäne in 3'-Richtung vervollständigt, hinter dem letzten kodierenden Basentriplett der VP2-Domäne ein Stopcodon in die Sequenz einführt und unmittelbar hinter diesem Stopcodon eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *BamHI* beinhaltet, verwendet wurde.

D) Der PCR-Ansatz aus C) wurde analog Beispiel 1 B) gereinigt und ein DNA-Fragment mit einer Länge von 564 bp erhalten.

E) Die weitere Verarbeitung erfolgte analog Beispiel 1 E) bis L), wobei der *Escherichia coli* Expressionsstamm XL1-pNCO-C-VP2-BS-LuSy erhalten wurde.

F) Die Überprüfung der Expressionsrate bzw. der Größe des monomeren Proteinstranges wurde analog Beispiel 1 M) durchgeführt. Im Rohextrakt des Stammes XL1-pNCO-C-VP2-BS-LuSy konnte eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 18,1 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne pNCO-C-VP2-BS-LuSy-Expressionsplasmid nicht zu sehen war. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca. 10 % bezogen auf alle löslichen Proteine (geschätzt).

G) Nach Überprüfung der Funktionalität gemäß Beispiel 1 N) bis Q) konnte kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp-Enzym beobachtet werden.

Beispiel 13

Fusion der VP2-Domäne an den N- und an den C-Terminus der Lumazinsynthase

A) Ausgehend von dem in Beispiel 11 erhaltenen Expressionsplasmid *pNCO-N-VP2-BS-LuSy*, welches die VP2-Domäne an das 5'-Ende des Lumazinsynthasegen fusioniert enthält, wurde analog Beispiel 12 die VP2 Domäne an das 3'-Ende des Lumazinsynthasegens fusioniert.

B) Die Überprüfung der Expressionsrate bzw. der Größe des monomeren Proteinstranges wurde analog Beispiel 1 M) durchgeführt. Im Rohextrakt des Stammes XL1-pNCO-N/C-VP2-BS-LuSy konnte eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 20 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne pNCO-N/C-VP2-BS-LuSy-Expressionsplasmid nicht zu sehen war. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca.

C) 10 % bezogen auf alle löslichen Proteine (geschätzt).

D) Nach Überprüfung der Funktionalität gemäß Beispiel 1 N) bis Q) konnte kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp-Enzym beobachtet werden.

Beispiel 14

Kopplung eines artifiziellen 13 Aminosäuren langen, *in vivo* biotinylierfähigen Peptids, an den C-Terminus der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*

A) Das Gen für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* wurde unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion und der synthetischen Oligonukleotide EcoRI-RBS-2 (siehe Beispiel 2 A)) und C-Biotag-1 (5' cat agc ttc gaa gat gcc gcc gag tgc ggc cgc ttc gaa aga acg gtt taa gtt tgc cat ttc 3'), welches an seinem 3'-Ende komplementär zum Gen für die Lumazinsynthase ist und unmittelbar hinter dem letzten kodierenden Basentriplett der Lumazinsynthase, DNA für einen Linker, bestehend aus 3 Alaninresten und einen Teil der DNA kodierend für das biotinylierfähige Peptid einführt, aus dem Plasmid pNCO-BS-LuSy (siehe Beispiel 1) amplifiziert. Die Durchführung der PCR erfolgte analog Beispiel 1 A).

B) Der PCR-Ansatz wurde gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 528 bp erhalten wurde, gereinigt und als DNA-Matrize für eine 2. PCR eingesetzt.

C) Die Durchführung der 2. PCR erfolgte analog Beispiel 1 C), wobei jedoch die Oligonukleotid-Kombination EcoRI-RBS-2 und C-Biotag-2 (5' tat tat gga tcc tta gcg cca ctc cat ctt cat agc ttc gaa gat gcc gcc gag tgc ggc 3'), welches die biotinylierfähige Domäne in 3'-Richtung vervollständigt, unmittelbar hinter dem letzten kodierenden Basentriplett dieser Domäne ein Stopcodon in die Sequenz einführt und unmittelbar hinter diesem Stopcodon eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *BamHI* beinhaltet, verwendet wurde.

D) Der PCR-Ansatz aus C) wurde analog Beispiel 1 B) gereinigt und ein DNA-Fragment mit einer Länge von 558 bp erhalten.

E) Die weitere Verarbeitung erfolgte analog Beispiel 1 E) bis L), wobei der *Escherichia coli* Expressionsstamm XL1-pNCO-C-Biotag-BS-LuSy erhalten wurde.

F) Bei der Überprüfung der Funktionalität der Lumazinsynthase gemäß Beispiel 1 N) konnte nur eine enzymatische Aktivität, die der Aktivität des *Escherichia coli* Stammes XL1 entsprach, ermittelt werden.

G) Die Überprüfung der Expressionsrate bzw. der Größe der löslichen Proteine wurde analog Beispiel 1 M) durchgeführt. Im Rohextrakt des Stammes XL1-pNCO-C-Biotag-BS-LuSy

konnte keine signifikante Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 18,5 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne pNCO-C-Biotag-BS-LuSy-Expressionsplasmid nicht zu sehen war.

H) Zur Herstellung eines Gesamtproteinextraktes wurden die Zellen analog Beispiel 1 K) kultiviert. 1/12 der gewonnenen Zellmasse wurde mit 300 µl Proteinauftragspuffer (siehe Beispiel 1 M)) suspendiert und 15 min auf siedendem Wasserbad gekocht. Nach dem Abkühlen wurden die verbliebenen unlöslichen Bestandteile der Proben in einer Eppendorfzentrifuge pelletiert (15000 Umin⁻¹, 5 min, 4 °C) und 8 µl des klaren Überstandes auf das Sammelgel aufgetragen. Das weitere Vorgehen erfolgte analog Beispiel 1 M). Es zeigte sich in Verbindung mit G), daß der Stamm *XL1-pNCO-C-Biotag-BS-LuSy* rekombinantes Protein in Form von unlöslichen Einschlußkörpern in einer Menge von ca. 15 % bezogen auf alle zellulären Proteine (lösliche und unlösliche Proteine, abgeschätzt vom SDS-PAGE) liefert.

I) Zum Nachweis des Lumazinsynthaseanteils im artifiziellen Lumazinsynthase-Fusionsprotein wurde eine Western-Blot Analyse analog Beispiel 1 Q), wobei jedoch zusätzlich zur löslichen Proteinfraktion auch die Gesamtproteinfraktion analysiert wurde, durchgeführt. Nach Entwicklung der Membran konnte rekombinantes Lumazinsynthase-Fusionsprotein nur in der Gesamtproteinfraktion, jedoch nur zu einem vernachlässigbaren Anteil in der löslichen Proteinfraktion nachgewiesen werden.

J) Zum Nachweis der Biotinylierung wurden sowohl die lösliche Proteinfraktion, als auch die Gesamtproteinfraktion auf eine Membran übertragen. Ausgehend von einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel (16 %) erfolgte die Übertragung der denaturierten Proteine über einen Zeitraum von 2 Stunden bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA. Nach erfolgter Transformation der Proteine auf die Membrane, wurde diese kurz in Antikörper-Waschpuffer-A (siehe Beispiel 1 Q)) gewaschen und anschließend in Antikörper-Waschpuffer-B 1 Stunde inkubiert. Danach wurde die Membran übernacht mit 20 µl Streptavidin gekoppelt an 'alkalische Phosphatase' (Promega, Madison, Wisconsin, USA) in einem Gesamtvolumen von 15 ml Antikörper-Waschpuffer-C geschwenkt. Nach der Inkubation wurde die Membran 3 x mit je 5 ml Antikörper-Waschpuffer-A gewaschen. Nach erfolgtem Waschen erfolgte die Detektion des Biotin-gebundenen Streptavidins via Zugabe der Substrate für die Alkalische Phosphatase. 50 µl BCIP-Stammlösung (25 mg 5-Brom-4-Chlor-indol-3-yl-phosphat in 500 µl Dimethylformamid lösen und lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahren) und 100 µl NBT-Stammlösung (50 mg Nitroblautetrazoliumchlorid in 700 µl

Dimethylformamid und 300 µl Wasser lösen und lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahren) werden in 15 ml Färbepuffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9,5) verdünnt. Nach Entwicklung der Membran in dieser Lösung konnte im Gesamtproteinextrakt rekombinantes, biotinyliertes Protein bei einem Molekulargewicht von ca. 18,5 kDa in Form einer blauen Bande, detektiert werden. Gesamtprotein aus dem *Escherichia coli* Stamm XL1 ohne das Plasmid *pNCO-C-Biotag-BS-LuSy* wies keine diesbezügliche Färbung auf. Nach erfolgter Anfärbung wurde die Membran in Wasser gewaschen und 5 min in einem Stop-Puffer (20 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA-Na₂, pH 8,0) inkubiert.

K) Zur Renaturierung des unlöslichen biotinylierten Lumazinsynthase-Fusionsproteins wurden zunächst die löslichen Proteinfraktionen gemäß Beispiel 1 L) abgetrennt.

L) Der unlösliche Rückstand aus K) wurde in 100 mM K-Phosphatpuffer, pH 7,0, der 6 M Harnstoff, 6 mM 5-Nitro-6-(D-ribitylamino)2,4-(1H,3H)-pyrimidindion und 100 mM Dithiothreitol (DTE) enthielt, während 24 Stunden unter Rühren bei Raumtemperatur solubilisiert. Die entstandene Proteinlösung wurde anschließend zweimal gegen das 10-fache Volumen 100 mM K-Phosphatpuffer, pH 7,0, der 1 mM 5-Nitro-6-(D-ribitylamino)2,4-(1H,3H)-pyrimidindion und 1 mM DTE enthielt, jeweils 12 Stunden bei 4 °C dialysiert. Nach Zentrifugation (Sorvall SS34-Rotor; 15000 Umin⁻¹; 20 min; 4 °C) wurde das im Überstand enthaltene Protein unter Verwendung einer Ultrazentrifuge konzentriert (Beckman TFT 70-Rotor; 32000 Umin⁻¹; 16 h; 4 °C). Die Analytik des renaturierten Proteins erfolgte gemäß den Ausführungen J), Beispiel 1 S) und Beispiel 1 P). Mit der oben beschriebenen Maßnahme konnte renaturiertes, ikosaedrisches, aus 60 Untereinheiten bestehendes Fusionsprotein erhalten werden.

M) Der Nachweis der Zugänglichkeit der Biotinmoleküle im nativen Protein erfolgte unter Verwendung von Mikrotiterplatten und eines Mehrkanalphotometers (ELISA-reader). 100 µl einer Avidin-Stammlösung (Sigma, München) mit der Konzentration 1 mg/ml wurden zunächst in 20 ml Beschichtungspuffer (20 mM Na-Carbonat, pH 9,6) verdünnt (Standardlösung). Jeweils 100 µl der Standardlösung wurden in die Probentaschen der Mikrotiterplatte pipettiert, die Probentaschen anschließend mit einer Klebefolie verschlossen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wurde anschließend abgegossen und jeder Napf 3 mal mit je 200 µl PBS (20 mM Na-Phosphat, 130 mM NaCl, pH 7,2) gewaschen. Die nicht mit Avidin bedeckte Kunststoffoberfläche der Probentasche wurde mit je 350 µl Abdecklösung (3 % Milchpulver in PBS) für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die

Abdecklösung wurde anschließend abgegossen und die Mikrotiterplatte kurz ausgeklopft. In die 1. von 8 Probentaschen wurde anschließend 100 µl der renaturierten Probenlösung aus L) (ca. 1 mg/ml) gegeben. In die Probentaschen 2 - 8 wurden jeweils 50 µl Verdünnungslösung (1 % Milchpulver in PBS) gegeben. Die 8. Probentasche wurde freigelassen. 50 µl aus Probentasche 1 wurden mit den 50 µl Verdünnungslösung in Probentasche 2 verdünnt (10 x auf und ab pipettieren). 50 µl aus Probentasche 2 wurden anschließend mit 50 µl Verdünnungslösung aus Probentasche 3 verdünnt, etc.. Zum Schluß wurden 50 µl aus Probentasche 7 verworfen, so daß nun alle Probentaschen 50 µl Probenlösung in verschiedenen Konzentrationen (log 2 Verdünnung) enthielten. Die Proben wurden mit Klebefolie abgedeckt und 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Probenlösungen wurden anschließend abgegossen, die Mikrotiterplatte kurz ausgeklopft und die Probentaschen 3 x mit jeweils 350 µl Waschlösung (PBS) gewaschen. Anschließend wurden 15 µl Streptavidin-Alkalische Phosphatase (Promega, Madison, Wisconsin, USA) in 20 ml Verdünnungslösung verdünnt (Detektionslösung). Jeweils 100 µl Detektionslösung wurden in die Probentaschen 1 - 8 pipettiert und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Detektionslösungen wurden anschließend abgegossen, die Mikrotiterplatte kurz ausgeklopft und die Probentaschen 3 x mit jeweils 350 µl Waschlösung (PBS) gewaschen. Die Entwicklung der Mikrotiterplatte erfolgte unter Zugabe von 150 µl Substratlösung (10 mg p-Nitrophenylphosphat in 10 ml Färbe puffer (siehe J)) für die Alkalische Phosphatase und Messung der Extinktion bei 405 nm. Da es sich bei der Lumazinsynthase um ein sphärisches Molekül handelt, liegen die Biotinmoleküle statistisch auf der Oberfläche verteilt vor. Befinden sich zuviele biotinylierte Lumazinsynthasemoleküle auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte (über Avidin an die Mikrotiterplatte gebunden), so sind die seitlichen Biotinmoleküle für eine Bindung an Streptavidin nicht mehr zugänglich. Erst nach Verringerung der Konzentration der biotinylierten Lumazinsynthasemoleküle werden die seitlichen Biotinmoleküle für eine Bindung an Streptavidin zugänglich, d.h. die Signalstärke steigt an.

Markierung des C-terminalen Endes der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* mit einer reaktiven Aminosäure

Die folgenden Beispiele beschreiben die Einführung von reaktiven Aminosäuren (Lysin und Cystein) am C-Terminus der Lumazinsynthase. Auf der Oberfläche der Lumazinsynthase sind

zwar basische Aminosäuren, die sich eventuell für eine kovalente Kopplung von chemischen Molekülen eignen vorhanden, ihre Zugänglichkeit ist jedoch durch benachbarte Aminosäurenreste eingeschränkt. Auf der Oberfläche der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* befinden sich keine freien Cysteinreste die sich, aufgrund ihrer Thiolgruppe für eine kovalente Kopplung von chemischen Molekülen eignen könnten.

Zur Verbesserung der Zugänglichkeit, bzw. zur Minimierung der sterischen Hinderung wurde ein Linker (Tentakel-Linker) zwischen dem C-Terminus der Lumazinsynthase und der betreffenden Aminosäure eingeführt, so daß die reaktiven Aminosäuren für nahezu jede chemische Kopplung mit Fremdmolekülen zugänglich werden.

Beispiel 15**Verlängerung des C-Terminus und Einführung einer terminalen basischen Aminosäure (Lysin) als Grundlage zur chemischen Kopplung von Zielmolekülen**

A) Das Gen für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* wurde mit den Oligonukleotiden EcoRI-RBS-2 (siehe Beispiel 2 A)) und C-Lys165 (5' tat tat gga tcc tta ttt acc aga gcc acc acc aga acc acc gcc acc ttc gaa aga acg gtt taa gtt tgc cat ttc 3'), welches an seinem 3'-Ende komplementär zum Gen für die Lumazinsynthase ist und unmittelbar hinter dem letzten kodierenden Basentriplett der Lumazinsynthase ein Gen, kodierend für das Peptid (Gly)₄Ser-(Gly)₃Ser-Gly-Lys, einführt, aus dem Plasmid pNCO-BS-LuSy amplifiziert. Unmittelbar hinter dem Codon für Lysin (aaa) an der Aminosäurenposition 165 wird mit dem Oligonukleotid C-Lys165 ein Stopcodon und eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *BamHI* in die DNA-Sequenz eingeführt. Die PCR wurde analog Beispiel 1 A) durchgeführt.

B) Die Reinigung des PCR-Ansatzes erfolgte gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 543 bp erhalten wurde.

C) Die weitere Vorgehensweise erfolgte analog Beispiel 1 B), E) bis L). Es wird das Plasmid *pNCO-Lys165-BS-LuSy* erhalten.

D) Die Überprüfung der Expressionsrate bzw. der Größe des monomeren Proteinstranges erfolgte analog Beispiel 1 M). Im Rohextrakt des Stammes XL1-pNCO-Lys165-BS-LuSy konnte eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 17 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne pNCO-Lys165-BS-LuSy-Expressionsplasmid nicht zu sehen war. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca. 10 % bezogen auf alle löslichen Proteine (geschätzt).

E) Die weitere Analytik wurde gemäß Beispiel 1 N) bis Q) durchgeführt, wobei keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp-Enzym (BS-LuSy) zu beobachten waren.

Beispiel 16**Verlängerung und Einführung eines terminalen Cysteinrestes an den C-Terminus der Lumazinsynthase als Grundlage zur chemischen Kopplung von Zielmolekülen**

A) Die Konstruktion erfolgte analog Beispiel 15 A) bis C), jedoch wurde anstelle des Oligonukleotids C-Lys165 das Oligonukleotid C-Cys167 (5' tat tat gga tcc tta gca gcc acc acc aga gcc acc acc gcc acc ttc gaa aga acg gtt taa gtt tgc cat ttc 3'), welches an

seinem 3'-Ende komplementär zum Gen für die Lumazinsynthase ist und unmittelbar hinter dem letzten kodierenden Basentriplett der Lumazinsynthase ein Gen, kodierend für das Peptid (Gly)₄Ser-(Gly)₃Ser-(Gly)₃-Cys, einführt, verwendet. Unmittelbar hinter dem Codon für Cystein 167 (tgc) wird mit dem Oligonukleotid C-Cys167 ein Stopcodon und eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *BamHI* in die DNA-Sequenz eingeführt. Es wurde ein DNA-Fragment mit einer Länge von 549 bp erhalten. Es wurde der *Escherichia coli* Stamm XL1-pNCO-Cys167-BS-LuSy erhalten.

- B) Bei der Überprüfung der Molekülmasse des monomeren Proteinstranges (Cys167-BS-LuSy) analog Beispiel 15 D) konnte eine Bande bei ca. 17,1 kDa beobachtet werden. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca. 5 % bezogen auf alle löslichen Proteine (geschätzt).
- C) Die weitere Analytik wurde gemäß Beispiel 1 N) bis Q) durchgeführt, wobei keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp-Enzym (BS-LuSy) zu beobachten waren.

Beispiel 17

Kopplung eines 12 Aminosäuren langen Peptids mit der Erkennungssequenz für einen monoklonalen Antikörper (Anti-FLAG-M2/IgG1/Maus) an den N-Terminus der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*

A) Das Gen für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* wurde mit den Oligonukleotiden FLAG-BS-LuSv-1 (5' ata ata ata aag *cit* atg aat atc ata caa gga aat tta g 3'), welches an seinem 3'-Ende komplementär zum 5'-Ende des Lumazinsynthasegens aus *Bacillus subtilis* und am 5'-Ende eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease HindIII einführt und Flag-BS-LuSy-2 (5' tat tat *gaa* ttc tta ttc gaa aga acg gtt taa g 3'), welches an seinem 3'-Ende komplementär zum 3'-Ende des Lumazinsynthasegens aus *Bacillus subtilis* und am 5'-Ende eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease EcoRI einführt, aus dem Plasmid pRF2 (vgl. Beispiel 1 A)) amplifiziert.

B) Der PCR-Ansatz wurde gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 492 bp erhalten wurde, gereinigt.

C) Das isolierte DNA-Fragment und der Vektor pFLAG-MAC (Eastman Kodak Company, New Haven) wurden zunächst mit der Restriktionsendonuklease HindIII verdaut.

30,0 µl pFLAG-MAC [5 µg] bzw. 30 µl isoliertes DNA-Fragment

3,0 µl HindIII [60 U]

10,0 µl OPAU (10 x)

57,0 µl H₂O_{bidest}

Der Ansatz wurde ebenfalls 180 min bei 37 °C inkubiert und das entstandene DNA-Fragment wie unter Beispiel 1 B) beschrieben gereinigt und zum Verdau mit der Restriktionsendonuklease EcoRI eingesetzt.

D) Das isolierte DNA-Fragment und der Vektor pFLAG-MAC aus C) wurden anschließend mit der Restriktionsendonuklease EcoRI verdaut.

30,0 µl DNA-Fragmente aus C)

3,0 µl EcoRI [60 U]

24,0 µl OPAU (10 x)

63,0 µl H₂O_{bidest}

Der Ansatz wurde 180 min bei 37 °C inkubiert und wie unter B) beschrieben gereinigt und zur Ligation eingesetzt.

E) Die weitere Vorgehensweise erfolgte gemäß Beispiel 1 G) bis L).

F) Nach Durchführung einer denaturierenden Polyacrylamidgelektrophorese gemäß Beispiel 1 M) konnte im Rohextrakt eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 17,7 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne pFLAG-MAC-BS-LuSy-Expressionsplasmid nicht zu sehen war. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca. 10 % bezogen auf alle löslichen Proteine (geschätzt).

G) Die Überprüfung der Funktionalität erfolgte analog Beispiel 1 N) bis P), wobei kein signifikanter Unterschied zum Wildtypenzym beobachtet werden konnte.

H) Zur immunologischen Überprüfung der Funktionalität des FLAG-Peptides wurde eine Western-Blot-Analyse gemäß Beispiel 1 Q), jedoch unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 'Anti-FLAG[®]M2' (Eastman Kodak Company, New Haven) als 1. Antikörper (10 µl Anti-FLAG[®]M2 in 5 ml TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4) und Anti-Maus-IgG-HRP-Konjugat als 2. Antikörper (10 µl Anti-Maus-IgG-HRP-Konjugat in 5 ml TBS; vgl. Beispiel 18 H)). Nach Entwicklung der Membran konnte das Fusionsprotein bei ca. 17,7 kDa detektiert werden.

I) Die Reinigung erfolgte analog Beispiel 2 S), es wurde jedoch kein Lysozym zum Aufschlußpuffer zugesetzt.

J) Negativ-Kontrastierung am Elektronenmikroskop gemäß Beispiel 1 P) zeigten hohle, sphärische Partikel mit einem Außendurchmesser von ca. 15 nm und einem Innendurchmesser von ca. 5 nm.

K) Die Überprüfung der Quartärstruktur wurde analog Beispiel 1 S) durchgeführt. Das gereinigte Lumazinsynthase-Fusionsprotein war als diskrete Bande auf dem nativen Gel zu sehen. Es konnte eine verringerte Mobilität im Vergleich zu einer Wildtyp-Lumazinsynthase, die auf den vergrößerten Durchmesser zurückzuführen ist, beobachtet werden.

Beispiel 18

Kopplung eines 6 Aminosäuren langen Peptids (6 x Histidin) zur Bindung an Ni-Chelat-Affinitätsmatrix, zur Bindung eines monoklonalen Antikörpers (Penta-His) bzw. zur Bindung von Ni-NTA-HRP-Konjugat an den C-Terminus der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*

A) Das Gen für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* wurde zunächst mit den Oligonukleotiden RibH-1 (vgl. Beispiel 1 A)) und RibH-His6-C-1 (5' gtg gtg atg gtg atg ttc gaa aga acg gtt taa g 3'), welches an seinem 3'-Ende komplementär zum 3'-Ende des Lumazin-

synthasegens aus *Bacillus subtilis* und am 5'-Ende für einen Teil des Affinitätspeptids kodiert, aus dem Plasmid pRF2 (vgl. Beispiel 1 A)) amplifiziert.

B) Der PCR-Ansatz wurde gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 492 bp erhalten wurde, gereinigt und als Matrize für eine 2. PCR gemäß Beispiel 1 C), jedoch mit der Oligonukleotidkombination EcoRI-RBS-2 (vgl. Beispiel 2 A)) und RibH-His6-C-2 (5' tat tat gga tcc tta atg gtg atg gtg atg 3'), welches die His6-Domäne in 3'-Richtung vervollständigt, unmittelbar hinter dem letzten kodierenden Basentriplett dieser Domäne ein Stopcodon in die Sequenz einführt und unmittelbar hinter diesem Stopcodon eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *BamHI* beinhaltet, verwendet wurde.

C) Der PCR-Ansatz aus B) wurde analog Beispiel 1 B) gereinigt und ein DNA-Fragment mit einer Länge von 528 bp erhalten.

D) Die weitere Verarbeitung erfolgte analog Beispiel 1 E) bis L), wobei der *Escherichia coli* Expressionsstamm XL1-*pNCO-C-His6-BS-LuSy* erhalten wurde.

E) Nach Durchführung einer denaturierenden Polyacrylamidgelektrophorese gemäß Beispiel 1 M) konnte im Rohextrakt eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 17,1 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne pNCO-C-His6-BS-LuSy-Expressionsplasmid nicht zu sehen war. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca. 30 % bezogen auf alle löslichen Proteine (geschätzt).

F) Die Überprüfung der Funktionalität erfolgte analog Beispiel 1 N) bis P), wobei kein signifikanter Unterschied zum Wildtypenzym beobachtet werden konnte.

G) Zur immunologischen Überprüfung der Funktionalität des His6-Peptides wurde eine Western-Blot-Analyse gemäß Beispiel 1 Q), jedoch unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 'Penta-His™ Antibody' (Qiagen, Hilden) als 1. Antikörper (10 µl Penta-His™ Antibody in 5 ml TBS (siehe Beispiel 17 H)) und Anti-Maus-IgG-HRP-Konjugat als 2. Antikörper (10 µl Anti-Maus-IgG-HRP-Konjugat in 5 ml TBS). Nach Entwicklung der Membran konnte das Fusionsprotein bei ca. 17,1 kDa detektiert werden.

H) Der Nachweis der Zugänglichkeit der His6-Peptide im nativen Protein erfolgte unter Verwendung von Mikrotiterplatten und eines Mehrkanalphotometers (ELISA-reader). In die 1. von 8 Probentaschen wurde je 100 µl der Rohextraktlösung aus D) (ca. 5-8 mg/ml Gesamtprotein) gegeben. In die Probentaschen 2 - 8 wurden jeweils 50 µl Verdünnungslösung (1 % Milchpulver in PBS) gegeben. Die 8. Probentasche wurde freigelassen. 50 µl aus Probentasche 1 wurden mit den 50 µl Verdünnungslösung in Probentasche 2 verdünnt (10

x auf und ab pipettieren). 50 µl aus Probentasche 2 wurden anschließend mit 50 µl Verdünnungslösung aus Probentasche 3 verdünnt, etc.. Zum Schluß wurden 50 µl aus Probentasche 7 verworfen, so daß nun alle Probentaschen 50 µl Probenlösung in verschiedenen Konzentrationen (log 2 Verdünnung) enthielten. Die Proben wurden mit Klebefolie abgedeckt und übernacht bei 37 °C inkubiert. Die nicht mit Fusionsprotein bedeckte Kunststoffoberfläche der Probentasche wurde mit je 350 µl Abdecklösung (3 % Milchpulver in PBS) für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Abdecklösung wurde anschließend abgegossen, die Mikrotiterplatte kurz ausgeklopft und die Probentaschen 3 x mit jeweils 350 µl Waschlösung (PBS) gewaschen. Anschließend wurden 10 µl Penta-His™ Antibody (Quiagen, Hilden) in 5 ml Verdünnungslösung verdünnt (1. Antikörper). Jeweils 50 µl 1. Antikörper wurden in die Probentaschen 1 - 8 pipettiert und 2 Stunde bei 37 °C inkubiert. Der 1. Antikörper wurde anschließend abgegossen, die Mikrotiterplatte kurz ausgeklopft und die Probentaschen 3 x mit jeweils 350 µl Waschlösung (PBS) gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 150 µl des 2. Antikörpers (10 µl Anti-Maus-IgG-HRP-Konjugat in 5 ml Verdünnungslösung, Sigma, München) mit einer Inkubationszeit von 2 h bei 37 °C. Der 2. Antikörper wurde anschließend abgegossen, die Mikrotiterplatte kurz ausgeklopft und die Probentaschen 3 x mit jeweils 350 µl Waschlösung (PBS) gewaschen. Die Entwicklung der Mikrotiterplatte erfolgte unter Zugabe von 150 µl Substratlösung (100 mg o-Phenyldiamin in 25 ml Substratpuffer, 50 mM Citronensäure, pH 5) für die Peroxidase und Messung der Extinktion bei 492 nm. Das Fusionsprotein konnte von den hochspezifischen Penta-His-Antikörpern erkannt werden. Es konnte eine konzentrationsabhängige (log2 Verdünnung von gebundenem Fusionsprotein) Signalverringerung beobachtet werden.

- I) Negativ-Kontrastierung am Elektronenmikroskop gemäß Beispiel 1 P) zeigten hohle, sphärische Partikel mit einem Außendurchmesser von ca. 15 nm und einem Innendurchmesser von ca. 5 nm.
- J) Die Überprüfung der Quartärstruktur wurde analog Beispiel 1 S) durchgeführt. Das gereinigte Lumazinsynthase-Fusionsprotein war als diskrete Bande auf dem nativen Gel zu sehen. Es konnte eine verringerte Mobilität im Vergleich zu einer Wildtyp-Lumazinsynthase, die auf den vergrößerten Durchmesser zurückzuführen ist, beobachtet werden.

Beispiel 19

Herstellung von Mischungen aus C-Biotag-BS-LuSy und C-His6-BS-LuSy auf dem Wege der gesteuerten *in vitro* Rückfaltung der unlöslichen Proteine

A) Die Kultivierung des *Escherichia coli* Stammes XL1-pNCO-C-Biotag-BS-LuSy (Beispiel 14) erfolgte gemäß Beispiel 1 K), jedoch in einem Volumen von 500 ml.

B) Die Kultivierung des *Escherichia coli* Stammes XL1-pNCO-C-His6-BS-LuSy (Beispiel 18) erfolgte ebenfalls gemäß Beispiel 1 K), jedoch in einem Volumen von 500 ml.

C) Der Aufschluß der Zellen aus A) erfolgte unter Verwendung einer Ultraschall-erzeugenden Apparatur (Branson-Sonifier B-12A, Branson SONIC Power Company, Dunbury, Connecticut). Zum Aufschluß wurde das gewaschene Zellpellet in 40 ml Abtrennpuffer (50 mM Tris pH 9,5) suspendiert und 10 min auf Eis gekühlt. Die Zellsuspension wurde dann 15 mal mit der Nadelsonde des Ultraschallgerätes bei Stufe 5 behandelt. Anschließend wurde die Suspension 5 min auf Eis gekühlt. Der Vorgang wurde insgesamt 4 mal wiederholt. Die Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge mit SS34-Rotor; 5000 Umin⁻¹, 4 °C, 10 min), der Überstand (Rohextrakt A-1) abgetrennt und das Zellpellet (Rückstand A-1) weiterverarbeitet.

D) Der Aufschlußvorgang wurde ein zweites Mal durchgeführt, wobei der Rückstand A-1 aus C) wiederum in 40 ml Abtrennpuffer suspendiert wurde. Die weitere Durchführung erfolgte analog C). Es wurde Rohextrakt A-2 und unlöslicher Rückstand A-2 erhalten.

E) Der Aufschluß der Zellen aus B) erfolgte ebenfalls unter Verwendung einer Ultraschall-erzeugenden Apparatur (Branson-Sonifier B-12A, Branson SONIC Power Company, Dunbury, Connecticut). Zum Aufschluß wurde das gewaschene Zellpellet in 40 ml Abtrennpuffer (50 mM Tris pH 9,5) suspendiert und 10 min auf Eis gekühlt. Die Zellsuspension wurde dann 15 mal mit der Nadelsonde des Ultraschallgerätes bei Stufe 5 behandelt. Anschließend wurde die Suspension 5 min auf Eis gekühlt. Der Vorgang wurde insgesamt 4 mal wiederholt. Die Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge mit SS34-Rotor; 15000 Umin⁻¹, 4 °C, 30 min), der Überstand-B abgetrennt und weiterverarbeitet.

F) Der unlösliche Rückstand A-2 (C-Biotag-BS-LuSy) aus D) wurde in 40 ml Solubilisierungspuffer (50 mM Tris, pH 9,5, 6 M Guanidiniumthiocyanat (G-SCN), 100 mM Dithiothreitol (DTE)), während 24 h unter Rühren bei Raumtemperatur solubilisiert.

G) Zum löslichen Überstand-B (40 ml) wurden 6 M G-SCN und 100 mM DTE gegeben und 24 h unter Rühren bei Raumtemperatur inkubiert.

H) Die Solubilisierungslösung aus F) wurde einer Zentrifugation (Sorvall SS34-Rotor; 15000 Umin⁻¹; 20 min; 25 °C) unterworfen und Rückstand-A-3 und Überstand-A-3 erhalten.

I) Anschließend wurden Portionen von Überstand-A-3 und Rückstand-A-3 unter Verwendung einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert.

J) Die Überprüfung der Überstände wurde analog Beispiel 1 M) durchgeführt.

K) Zur Überprüfung von Rückstand-A-3 wurde eine Spatelspitze des Rückstandes mit 200 µl Proteinauftragspuffer (siehe Beispiel 1 M)) suspendiert und 15 min auf siedendem Wasserbad gekocht. Nach dem Abkühlen wurden die verbliebenen unlöslichen Bestandteile der Probe in einer Eppendorfzentrifuge pelletiert (15000 Umin⁻¹, 5 min, 4 °C) und 6 µl des klaren Überstandes auf das Sammelgel aufgetragen. Das weitere Vorgehen erfolgte analog Beispiel 1 M).

L) Aus J) und K) zeigte sich, daß sich das unlösliche Protein C-Biotag-BS-LuSy zu ca. 80 % unter den angegebenen Bedingungen solubilisieren läßt.

M) Der erhaltene Rückstand-A-3 aus H) wurde nochmals den Schritten F) und H) bis K) unterworfen. Die Solubilisierungsrate konnte nicht verbessert werden.

N) Die Fusionsproteinmengen der beiden Überstände A-3 und B waren vergleichbar.

O) 2 ml Überstand-C-Bio-BS-LuSy (Überstand-A-3) und 2 ml Überstand-C-His6-BS-LuSy (Überstand-B) wurden gemischt (Mischung A).

P) 3,5 ml Überstand-C-Bio-BS-LuSy und 0,5 ml Überstand-C-His6-BS-LuSy wurden gemischt (Mischung B).

Q) Mischung A und Mischung B wurden 48 h bei Raumtemperatur gerührt.

R) Mischung A und Mischung B aus Q) wurden anschließend gegen 400 ml Abtrennpuffer, der 8 M Harnstoff und 1 mM DTE enthielt während 18 h bei Raumtemperatur dialysiert.

S) Zu beiden Mischungen wurde anschließend 6,6 mM 5-Nitro-6-(D-ribitylamino)2,4-(1H,3H)-pyrimidindion gegeben und 8 h bei Raumtemperatur gerührt und Mischung A-Nitro bzw. Mischung B-Nitro erhalten.

T) Mischung A-Nitro und Mischung B-Nitro wurden in einen Dialyseschläuch überführt und gegen 32 ml (5-faches Volumen) Rückfaltungspuffer A (100 mM K-Phosphatpuffer, pH 7,0, 1 mM 5-Nitro-6-(D-ribitylamino)2,4-(1H,3H)-pyrimidindion, 1 mM DTE, 0,02 % Na-Azid) 12 Stunden bei 4 °C dialysiert und Mischung A-1/5 und Mischung B-1/5 erhalten.

U) Anschließend wurde der Dialysepuffer aus T) mit 40 ml Rückfaltungspuffer B (100 mM K-Phosphatpuffer, pH 7,0, 1 mM DTE, 0,02 % Na-Azid) verdünnt und weitere 24 h bei 4 °C dialysiert (Mischung A-1/10 und Mischung B-1/10).

V) Anschließend wurde der Dialysepuffer aus U) mit 80 ml Rückfaltungspuffer B verdünnt und weitere 24 h bei 4 °C dialysiert und die Dialysate Mischung A-1/20 und Mischung B-1/20 erhalten.

W) Mischung A-1/20 und Mischung B-1/20 wurden anschließend gegen 72 ml (10-faches Volumen) Rückfaltungspuffer C (100 mM K-Phosphatpuffer, pH 7,0, 1 mM DTE, 0,25 mM 5-Nitro-6-(D-ribitylamino)2,4-(1H,3H)-pyrimidindion, 0,02 % Na-Azid) 24 h bei 4 °C dialysiert und Mischung A-1/200 und Mischung B-1/200 erhalten.

X) Nach Zentrifugation (Sorvall SS34-Rotor; 15000 Umin⁻¹; 20 min; 4 °C) wurden Portionen von Überstand-Mischung A-1/200 bzw. Mischung B-1/200 und Rückstand-Mischung A-1/200 bzw. Mischung B-1/200 unter Verwendung einer SDS-Polyacrylamidgelektrophorese analysiert.

Y) Die Überprüfung der Überstände wurde analog Beispiel 1 M) durchgeführt.

Z) Die Überprüfung der Rückstände erfolgte analog K).

AA) Aus Y) und Z) zeigte sich, daß sich ca. 50-80 % gemischtes Lumazinsynthase-Konjugat unter den angegebenen Bedingungen erzeugen läßt. Die Fusionsproteinmengen der eingesetzten Proteinmengen entsprachen sich im rückgefalteten Zustand (abgeschätzt vom SDS-PAGE), so daß kein Unterschied im Rückfaltungsverhalten der beiden Fusionsproteine festgestellt werden konnte.

BB) Die Überprüfung der Quartärstruktur erfolgte analog Beispiel 1 S), wobei jedoch 40 µl Proteinlösung (Überstand-Mischung A-1/200, Überstand-Mischung B-1/200) eingesetzt wurde. Die renaturierten Fusionsprotein-Mischungen waren als diskrete Banden auf dem nativen Polyacrylamidgl zu sehen. Die Mobilität war vergleichbar mit den Mobilitäten der renaturierten Proteine C-Bio-BS-LuSy und C-His6-BS-LuSy, was höchstwahrscheinlich auf den ähnlichen hydrodynamischen Durchmesser der Proteine zurückzuführen ist. Mit der oben beschriebenen Maßnahme konnte demnach renaturiertes, ikosaedrisches, aus 60 Untereinheiten bestehendes Fusionsprotein erhalten werden.

CC) Der Nachweis der beiden Untereinheiten im renaturierten ikosaedrischen Protein erfolgte unter Verwendung von Mikrotiterplatten und eines Mehrkanalphotometers (ELISA-reader). Die Beschichtung der Näpfe mit Avidin erfolgte analog Beispiel 14 M). In die 1. von 8 Probentaschen wurde je 100 µl der renaturierten Probenlösung aus W) (ca. 0,5-1 mg/ml) gegeben. In die Probentaschen 2 - 8 wurden jeweils 50 µl Verdünnungslösung (1 % Milchpulver in PBS) gegeben. Die 8. Probentasche wurde freigelassen. 50 µl aus Probentasche 1 wurden mit den 50 µl Verdünnungslösung in Probentasche 2 verdünnt (10

x auf und ab pipettieren). 50 µl aus Probentasche 2 wurden anschließend mit 50 µl Verdünnungslösung aus Probentasche 3 verdünnt, etc.. Zum Schluß wurden 50 µl aus Probentasche 7 verworfen, so daß nun alle Probentaschen 50 µl Probenlösung in verschiedenen Konzentrationen (log 2 Verdünnung) enthielten. Die Proben wurden mit Klebefolie abgedeckt und übernacht bei 37 °C inkubiert und danach wurde 3 x mit jeweils 350 µl Waschlösung (PBS) gewaschen. Anschließend wurden 10 µl Penta-His™ Antibody (Quiagen, Hilden) in 5 ml Verdünnungslösung verdünnt (1. Antikörper). Jeweils 50 µl 1. Antikörper wurden in die Probentaschen 1 - 8 pipettiert und 2 Stunde bei 37 °C inkubiert. Der 1. Antikörper wurde anschließend abgegossen, die Mikrotiterplatte kurz ausgeklopft und die Probentaschen 3 x mit jeweils 350 µl Waschlösung (PBS) gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 150 µl des 2. Antikörpers (10 µl Anti-Maus-IgG-HRP-HRP-Konjugat in 5 ml Verdünnungslösung, Sigma, München) mit einer Inkubationszeit von 2 h bei 37 °C. Der 2. Antikörper wurde anschließend abgegossen, die Mikrotiterplatte kurz ausgeklopft und die Probentaschen 3 x mit jeweils 350 µl Waschlösung (PBS) gewaschen. Die Entwicklung der Mikrotiterplatte erfolgte unter Zugabe von 150 µl Substratlösung (100 mg o-Phenyldiamin in 25 ml Substratpuffer, 50 mM Citronensäure, pH 5) für die Peroxidase und Messung der Extinktion bei 492 nm. Überstand-Mischung A-1/200 und Überstand-Mischung B-1/200 konnten von den hochspezifischen Penta-His-Antikörpern erkannt werden. Es konnte eine konzentrations-abhängige (log2 Verdünnung von gebundenem Fusionsprotein) Signalverringerung beobachtet werden. Bei Überstand-Mischung A-1/200 konnte ein stärkeres Signal als bei Überstand-Mischung B-1/200 beobachtet werden. Zur Bindung an die Avidin-beschichtete Mikrotiterplatte genügt theoretisch ein Biotinmolekül, während die Signalstärke mit der Anzahl von His6-Epitopen pro Molekül korelliert. In Überstand-Mischung A-1/200 sind pro Ikosaeder mehr His6-Epitope enthalten als im Vergleichskonstrukt Überstand-Mischung B-1/200, so daß bei Überstand-Mischung A-1/200, wie der praktische Versuch bestätigt, ein stärkeres Signal zu erwarten ist. Aus diesem Ergebnis folgt, daß mit den oben beschriebenen Rückfaltungsmaßnahmen Ikosaeder erhalten wurden, die aus verschiedenen Untereinheiten bestehen.

Beispiel 20

Herstellung der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* unter Verwendung von 11, an die *Escherichia coli* Codonsverwendung angepasster synthetischer Oligonukleotide und einer 6-stufigen Polymerase-Kettenreaktion (Deckert et al., 1998)

A) Das erste Teilstück des Gen für die Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* wurde mit den Oligonukleotiden AQUI-1 (5' gct gcg ggt gaa ctg gcg cgt aaa gag gac att gat gct gtt atc gca att ggc gtt ctc atc 3'; Strangprimer) und AQUI-2 (5' cta atg aaa ggt tcg cga ggc ctt ttg aaa ctt cag agg cga tat aat cga aat gtg gcg ttg 3'; Gegenstrangprimer) unter Verwendung des Gens für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* als Matrize (Vektor pNCO-BS-LuSy, vgl. Beispiel 1 G)) amplifiziert. Beide Oligonukleotide wurden an die optimale Codonverwendung (für stark exprimierte Gene; Grosjean und Fiers, 1982; Ikemura, 1981; Wada et al. 1992) von *Escherichia coli* angepasst. AQUI-1 enthält die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease MfeI (C*AATTG) und AQUI-2 für StuI (AGG*CCT).

10 µl PCR-Puffer (75 mM Tris/HCl, pH 9.0; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0.01 % (w/v) Tween 20)

6 µl Mg²⁺ [1,5 mM]

8 µl dNTP's [je 200 µM]

1 µl AQUI-1 [0,5 µM]

1 µl AQUI-2 [0,5 µM]

1 µl pNCO-BS-LuSy (vgl. Beispiel 1) [10 ng]

1 µl Goldstar-Taq-Polymerase [0,5 U] (Eurogentec, Seraing, Belgien)

72 µl H₂O_{bdest}

Der Ansatz wurde im Thermocycler (GeneAmp[®] PCR System 2400; Perkin Elmer)

bei folgenden Bedingungen durchgeführt: 1. 5,0 min 95 °C

2. 0,5 min 94 °C

3. 0,5 min 50 °C

4. 0,5 min 72 °C

5. 5,0 min 72 °C

6. abkühlen auf 4 °C

Die Schritte 2. - 4. wurden 20 x wiederholt.

B) Der PCR-Ansatz wurde mittels Agarosegelektrophorese (3 % Agarose) aufgetrennt, die DNA durch Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und das Fragment mit einer Länge von 132 bp mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die weitere Aufreinigung erfolgte gemäß Beispiel 1 B).

C) 10 ng der isolierten DNA aus B) dienten anschließend als Matrize für eine 2.PCR mit den Oligonukleotiden AQUI-3 (5' act ctg gtt cgt gtt cca ggc tca tgg gaa ata ccg gtt gct gcg ggt gaa ctg gcg cgt aaa g 3'; Strangprimer) und AQUI-4 (5' cca agg tgt cag ctg taa taa cac cga agg tga tag gtt tac gta gtt cta atg aaa ggt tcg cga ggc c 3'; Gegenstrangprimer). Beide Oligonukleotide wurden an die optimale Codonverwendung für stark exprimierte Gene (Grosjean und Fiers, 1982; Ikemura, 1981; Wada et al. 1992) von *Escherichia coli* angepasst. AQUI-3 enthält die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Age*I (A*CCGGT) und AQUI-4 für *Sna*BI (TAC*GTA) und *Pvu*II (CAG*CTG). Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte wie unter A) beschrieben.

D) Das Produkt aus C) wurde wie unter B) beschrieben gereinigt und ein DNA-Fragment mit einer Länge von 219 bp erhalten.

E) 10 ng der isolierten DNA aus D) dienten anschließend als Matrize für eine 3.PCR mit den Oligonukleotiden AQUI-5 (5' gga ggg tgc aat tga ttg cat agt ccg tca tgg cgg ccg tga aga aga cat tac tct ggt tcg tgt tcc agg c 3'; Strangprimer) und AQUI-6 (5' gtt gcc gtg ttt tgt gcc ggc gcg ctc gat agc ctg ttc caa ggt gtc agc tgt aat aac 3'; Gegenstrangprimer). Beide Oligonukleotide wurden an die optimale Codonverwendung (für stark exprimierte Gene) von *Escherichia coli* angepasst. AQUI-5 enthält die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Eag*I (C*GGCCG) und AQUI-6 für *Bss*HII (G*CGCGC) und *Pvu*II (CAG*CTG). Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte wie unter A) beschrieben.

F) Das Produkt aus E) wurde wie unter B) beschrieben gereinigt und ein DNA-Fragment mit einer Länge von 309 bp erhalten.

G) 10 ng der isolierten DNA aus F) dienten anschließend als Matrize für eine 4.PCR mit den Oligonukleotiden AQUI-7 (5' cgg tat cgt agc atc acg ttt taa tca tgc tct tgt cga ccg tct ggt gga ggg tgc aat tga ttg cat ag 3'; Strangprimer) und AQUI-8 (5' gaa taa gtt tgc cat ttc aat ggc aga aag cgc tgc ttc cca acc ttt gtt gcc gtg ttt tgt gcc ggc 3'; Gegenstrangprimer). Beide Oligonukleotide wurden an die optimale Codonverwendung (für stark exprimierte Gene) von *Escherichia coli* angepasst. AQUI-7 enthält die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Sal*I (G*TCGAC) und AQUI-8 für *Eco*47III (AGC*GCT). Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte wie unter A) beschrieben.

H) Das Produkt aus G) wurde wie unter B) beschrieben gereinigt und ein DNA-Fragment mit einer Länge von 405 bp erhalten.

I) 10 ng der isolierten DNA aus H) dienten anschließend als Matrize für eine 5.PCR mit den Oligonukleotiden AQUI-9 (5' atg caa atc tac gaa ggt aaa cta act gct gaa ggc ctt cgt ttc ggt

atc gta gca tca cgt ttt aat c 3': Strangprimer) und AQUI-10 (5' tat tat gga tcc tta tcg gag aga ctt gaa taa gtt tgc cat ttc aat gg 3': Gegenstrangprimer). Beide Oligonukleotide wurden an die optimale Codonverwendung (für stark exprimierte Gene) von *Escherichia coli* angepasst. AQUI-9 vervollständigt das Gen für die Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* und enthält die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Stu*I (AGG*CCT). Das Oligonukleotid AQUI-10, welches am 3'-Ende zum Gen der Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* komplementär ist, führt unmittelbar hinter dem Stopcodon eine Erkennungssequenz für die Endonuklease *Bam*HI (G*GATCC) ein. Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte wie unter A) beschrieben.

J) Das Produkt aus I) wurde wie unter B) beschrieben gereinigt und ein DNA-Fragment mit einer Länge von 476 bp erhalten.

K) 10 ng der isolierten DNA aus J) dienten anschließend als Matrize für eine 6.PCR mit den Oligonukleotiden AQUI-11 (5' ata ata gaa itc att aaa gag gag aaa tta act atg caa atc tac gaa ggt aaa cta ac 3'; Strangprimer) und AQUI-10 (Gegenstrangprimer). Das Oligonukleotid AQUI-11 ist am 3'-Ende zum 5'-Ende des synthetischen Gens für die Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* komplementär. Am 5'-Ende führt es eine ribosomale Bindungsstelle und eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Eco*RI vor dem Startcodon ein. Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte wie unter A) beschrieben.

L) Das Produkt aus K) wurde wie unter B) beschrieben gereinigt und ein DNA-Fragment mit einer Länge von 510 bp erhalten.

M) Die weitere Verarbeitung des DNA-Fragmentes aus L) erfolgte wie unter Beispiel 1 E)-G) wobei das Plasmid pNCO-AA-LuSy erhalten wurde.

N) Anschließend wurden die Schritte H)-M) gemäß Beispiel 1 durchgeführt. Im Rohextrakt des Stammes XL1-pNCO-AA-LuSy konnte eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 16,7 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne das betreffende Plasmid nicht zu sehen war. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca 20 % bezogen auf alle löslichen Proteine.

O) Die Überprüfung der Funktionalität erfolgte gemäß Beispiel 1 N). Das Protein zeigte eine optimale Aktivität im Bereich von 80 - 90 °C.

P) Die Negativkontrastierung erfolgte gemäß Beispiel 1 P) und zeigte hohle, sphärische Partikel mit einem Außendurchmesser von ca. 15 nm und einem Innendurchmesser von ca. 5 nm.

Q) Die Reinigung des Proteins erfolgte in zwei Schritten: Die Kultivierung des *Escherichia coli* Stammes XL1-pNCO-AA-LuSy erfolgte gemäß Beispiel 1 K), jedoch in einem Volumen von 1 l. Der Aufschluß erfolgte gemäß Beispiel 1 R). Der klare Überstand wurde anschließend im Wasserbad 20 min bei 90 °C inkubiert. Die Suspension wurde anschließend zentrifugiert (Sorvall SS34-Rotor; 15000 Umin⁻¹; 4 °C; 30 min). Mit diesem Schritt konnte eine Anreicherung des Zielproteins um Faktor 4 erreicht werden (abgeschätzt von SDS-PAGE). Die weitere Reinigung erfolgte gemäß Beispiel 2 S) unter Verwendung des Überstandes nach der Zentrifugation und einer Gelfiltrationssäule.

R) Die Überprüfung der Quartärstruktur erfolgte gemäß Beispiel 1 S) und ergab ein mit der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* vergleichbares Ergebnis.

Beispiel 21

Kopplung eines artifiziellen 13 Aminosäuren langen, in vivo biotinylierfähigen Peptids, an den C-Terminus der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*

A) Das Gen für die synthetische Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* wurde unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion und der synthetischen Oligonukleotide EcoRI-RBS-2 (siehe Beispiel 2 A)) und AQUI-C-NotI (5' tat tat tat tat agc ggc cgc tcg gag aga ctt gaa taa g 3') aus dem Plasmid pNCO-AA-LuSy (siehe Beispiel 20) amplifiziert. Das Oligonukleotid AQUI-C-NotI ist an seinem 3'-Ende komplementär zum Gen für die Lumazinsynthase und führt unmittelbar hinter dem letzten kodierenden Basentriplett der Lumazinsynthase eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease NotI (GC*GGCCGC) ein. Diese Erkennungssequenz wird in drei Alaninmoleküle translatiert. Die Durchführung der PCR erfolgte analog Beispiel 1 A).

B) Der PCR-Ansatz wurde gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 513 bp erhalten wurde, gereinigt.

C) Das gereinigte DNA-Fragment aus B) wurde mit der Restriktionsendonuklease NotI analog Beispiel 8 F) verdaut und anschließend gemäß Beispiel 1 B) gereinigt.

D) Das gereinigte DNA-Fragment aus C) wurde analog Beispiel 8 H) mit der Restriktionsendonuklease EcoRI behandelt und ein Fragment mit der Länge von 498 bp erhalten.

E) 5 µg des Expressionsplasmids *pNCO-C-Biotag-BS-LuSy* (Beispiel 14) in einem Volumen von 30 µl wurden analog Beispiel 8 G) und H) behandelt. Das DNA-Fragment mit einer Länge von 3437 bp wurde isoliert und gereinigt.

F) Die weitere Verarbeitung erfolgte analog Beispiel 1 E) bis L), wobei der *Escherichia coli* Expressionsstamm XL1-*pNCO-C-Biotag-AA-LuSy* erhalten wurde.

G) Bei der Überprüfung der Funktionalität der Lumazinsynthase gemäß Beispiel 1 N) konnte nur eine enzymatische Aktivität, die der Aktivität des *Escherichia coli* Stammes XL1 entsprach, ermittelt werden.

H) Die Überprüfung der Expressionsrate bzw. der Größe der löslichen Proteine wurde analog Beispiel 1 M) durchgeführt. Im Rohextrakt des Stammes XL1-*pNCO-C-Biotag-AA-LuSy* konnte keine signifikante Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 18,5 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne pNCO-C-Biotag-AA-LuSy-Expressionsplasmid nicht zu sehen war.

I) Die weitere Verarbeitung erfolgte analog Beispiel 14 H) bis M). Es konnte ein vergleichbares Ergebnis erzielt werden.

Beispiel 22

Kopplung eines artfiziellen 13 Aminosäuren langen, in vivo biotinylierfähigen Peptids, über einen Linker bestehend aus der Aminosäurenfolge H-H-H-H-H-A-A-A an den C-Terminus der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*

A) Das Gen für die synthetische Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* wurde analog Beispiel 21 unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion und der synthetischen Oligonukleotide EcoRI-RBS-2 (siehe Beispiel 2 A)) und AQUI-C-HIS₆-NotI (5' tat tat tat agc ggc cgc atg gtg atg gtg atg tcg gag aga ctt gaa taa gtt tgc 3') aus dem Plasmid pNCO-AA-LuSy (siehe Beispiel 20) amplifiziert. Das Oligonukleotid AQUI-C-HIS₆-NotI ist an seinem 3'-Ende komplementär zum Gen für die Lumazinsynthase und führt unmittelbar hinter dem letzten kodierenden Basentriplett der Lumazinsynthase eine Sequenz, kodierend für 6 Histidinmoleküle und eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease NotI (GC*GGCCGC) ein. Diese Erkennungssequenz wird in drei Alaninmoleküle translatiert. Die Durchführung der PCR erfolgte analog Beispiel 1 A).

B) Der PCR-Ansatz wurde gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 531 bp erhalten wurde, gereinigt.

C) Das gereinigte DNA-Fragment aus B) wurde mit der Restriktionsendonuklease NotI analog Beispiel 8 F) verdaut und anschließend gemäß Beispiel 1 B) gereinigt.

D) Das gereinigte DNA-Fragment aus C) wurde analog Beispiel 8 H) mit der Restriktionsendonuklease EcoRI behandelt und ein Fragment mit der Länge von 516 bp erhalten.

E) Der Expressionsvektor wurde gemäß Beispiel 21 E) vorbereitet.

F) Die weitere Verarbeitung erfolgte analog Beispiel 1 E) bis J), wobei der *Escherichia coli* Expressionsstamm XL1-pNCO-HIS6-C-Biotag-4A-LuSy erhalten wurde.

G) Die Kultivierung der Zellen erfolgte nach Beispiel 1 R). Nach der Zentrifugation wurde der klare Überstand verworfen und mit dem verbliebenen Rückstand weitergearbeitet.

H) Der unlösliche Rückstand aus G) wurde in 50 ml NTA-Puffer A (50 mM Na-Phosphat-Puffer pH 8,0, 300 mM NaCl, 0,02 % Na-Azid, 6 M Guanidiniumhydrochlorid) während 24 Stunden unter Rühren bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation (Sorvall SS34-Rotor, 15000 Umin⁻¹, 20 °C, 20 min). Der Überstand wurde dekantiert und mit 6 ml Ni-NTA-Agarose (Quiagen, Hilden) versetzt und über Nacht unter umschwenken inkubiert (20 °C). Anschließend wurde die Suspension einer Zentrifugation unterworfen (800 g, 20 °C, 10 min). Der Überstand wurde dekantiert. Der Rückstand wurde in 10 ml NTA-Puffer-A aufgenommen und 15 min unter umschwenken bei 20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (s.o.) und Abnahme des Überstandes wurde der Rückstand in 10 ml NTA-Puffer-B (8 M Harnstoff, 100 mM Na-Phosphat-Puffer, 10 mM Tris pH 6,3) für 15 min bei 20 °C inkubiert und weiterverarbeitet (s.o.). Der Vorgang wurde ein zweites Mal wiederholt. Anschließend wurde der Rückstand zweimal mit je 10 ml NTA-Puffer-C (8 M Harnstoff, 100 mM Na-Phosphat-Puffer, 10 mM Tris pH 5,9) behandelt. Zum Schluß wurde der Rückstand zweimal mit je 10 ml NTA-Puffer-D (8 M Harnstoff, 100 mM Na-Phosphat-Puffer, 10 mM Tris pH 4,5) gewaschen. Die Verunreinigungen konnten mit NTA-Puffer-B entfernt werden, das Zielprotein wurde mit NTA-Puffer-C bzw. D eluiert. Auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel (nach Neutralisation) gemäß Beispiel 1 M) konnte nur noch eine singuläre Bande bei 19,3 kDa beobachtet werden.

Beispiel 23

Kopplung eines artifiziellen 13 Aminosäuren langen, in vivo biotinylierfähigen Peptids, über einen Linker bestehend aus den Aminosäuren H-H-H-H-H-H-G-G-S-G-A-A-A an den C-Terminus der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*

A) Das Gen für die synthetische Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* wurde analog Beispiel 21 unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion und der synthetischen Oligonukleotide EcoRI-RBS-2 (siehe Beispiel 2 A)) und AQUI-C-HIS₆-GLY₂-SER-GLY-NotI (5' tat tat tat agc ggc cgc gcc aga acc gcc atg gtg gtg atg gtg atg tcg gag aga ctt gaa taa gtt tgc 3') aus

dem Plasmid pNCO-AA-LuSy (siehe Beispiel 20) amplifiziert. Das Oligonukleotid AQUI-C-HIS₆-GLY₂-SER-GLY-NotI ist an seinem 3'-Ende komplementär zum Gen für die Lumazinsynthase, führt unmittelbar hinter dem letzten kodierenden Basentriplett der Lumazinsynthase eine Sequenz, kodierend für das Peptid H-H-H-H-H-G-G-S-G, und eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease NotI (GC*GGCCGC) ein. Diese Erkennungssequenz wird in drei Alaninmoleküle translatiert. Die Durchführung der PCR erfolgte analog Beispiel 1 A).

B) Der PCR-Ansatz wurde gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 543 bp erhalten wurde, gereinigt.

C) Das gereinigte DNA-Fragment aus B) wurde mit der Restriktionsendonuklease NotI analog Beispiel 8 F) verdaut und anschließend gemäß Beispiel 1 B) gereinigt.

D) Das gereinigte DNA-Fragment aus C) wurde analog Beispiel 8 H) mit der Restriktionsendonuklease EcoRI behandelt und ein Fragment mit der Länge von 528 bp erhalten.

E) Der Expressionsvektor wurde gemäß Beispiel 21 E) vorbereitet.

F) Die weitere Verarbeitung erfolgte analog Beispiel 1 E) bis L), wobei der *Escherichia coli* Expressionsstamm XL1-pNCO-HIS6-GLY2-SER-GLY-C-Biotag-AA-LuSy erhalten wurde.

G) Die weitere Verarbeitung erfolgte gemäß Beispiel 22 G) bis H) wobei ein vergleichbares Ergebnis erzielt wurde.

Beispiel 24

Herstellung eines chimären Proteins bestehend aus einem Teil der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* und einem Teil der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*

A) Ein Teil des Gens für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* wurde unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion und der synthetischen Oligonukleotide EcoRI-RBS-2 (siehe Beispiel 2 A)) und BS-LuSy-AgeI (5' tat tat tat aac cgg tat ttc aaa tgc gcc 3') aus dem Plasmid pNCO-BS-LuSy (siehe Beispiel 1) amplifiziert. Das Oligonukleotid BS-LuSy-AgeI ist an seinem 3'-Ende komplementär zum Gen für die Lumazinsynthase und führt eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease AgeI (A*CCGGT) in die DNA-Sequenz ein. Die Durchführung der PCR erfolgte analog Beispiel 1 A).

B) Der PCR-Ansatz wurde gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 225 bp erhalten wurde, gereinigt. Das gereinigte DNA-Fragment aus B) wurde mit der Restriktionsendonuklease *AgeI* verdaut.

30,0 µl DNA-Fragmente aus C)

4,0 µl *AgeI* [8 U]

10,0 µl Puffer 1 (10 x) [10 mM Bis-Tris-Propane-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,0]

56,0 µl H₂O_{bidest}

Der Ansatz wurde 180 min bei 25 °C inkubiert und wie unter B) beschrieben gereinigt und zum Verdau mit der Restriktionsendonuklease EcoRI eingesetzt.

C) Verdau des gereinigten Fragmentes aus B) mit der Restriktionsendonuklease EcoRI.

30,0 µl DNA-Fragment aus B)

3,0 µl EcoRI [60 U]

20,0 µl OPAU (10 x)

47,0 µl H₂O_{bidest}

Der Ansatz wurde 180 min bei 37 °C inkubiert und das entstandene DNA-Fragment wie unter Beispiel 1 B) beschrieben gereinigt.

D) Das Plasmid PNCO-AA-LuSy (30 µl, 5 µg) wurde analog B) und C) behandelt und anschließend gemäß Beispiel 1 B) gereinigt, wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 3676 bp erhalten wurde.

E) Die weitere Verarbeitung erfolgte analog Beispiel 1 E) bis L), wobei der *Escherichia coli* Expressionsstamm XL1-*pNCO-BS-LuSy-AgeI-AA-LuSy* erhalten wurde.

F) Bei der Überprüfung der Funktionalität der Lumazinsynthase gemäß Beispiel 1 N) konnte eine enzymatische Aktivität ermittelt werden.

G) Die Überprüfung der Expressionsrate bzw. der Größe der löslichen Proteine wurde analog Beispiel 1 M) durchgeführt. Im Rohextrakt des Stammes XL1- *pNCO-BS-LuSy-AgeI-AA-LuSy* konnte eine signifikante Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 16,4 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne pNCO-BS-LuSy-AgeI-AA-LuSy Expressionsplasmid nicht zu sehen war.

Beispiel 25

Herstellung eines Vektors zur rekombinanten N-terminalen Fusion von Fremdpeptiden an die Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* (Fremdpeptide können auch ohne Linker direkt an das Trägerprotein fusioniert werden; hierfür wird die singuläre

Restriktionsschnittstelle BglII verwendet, die sich in der Sequenz des Trägerproteins befindet)

A) Das Gen für die Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* wurde mit den Oligonukleotiden AQUI-11-BglII (5' ata ata gaa ttc att aaa gag gag aaa tta act atg cag atc tac gaa gg 3'), welches am 3'-Ende teilweise komplementär zum 5'-Ende der Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* ist, wobei durch eine stille Mutation eine singuläre Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease BglII (A*GATCT) eingeführt wird und am 5'-Ende eine ribosomale Bindungsstelle und eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease EcoRI einführt, und AQUI-10 (siehe Beispiel 20 I)) aus dem Plasmid pNCO-AA-LuSy amplifiziert. Die PCR wurde analog Beispiel 1 A) durchgeführt.

B) Die Reinigung des PCR-Ansatzes erfolgte gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 510 bp erhalten wurde.

C) Die weitere Vorgehensweise erfolgte analog Beispiel 1 B), E) bis L). Es wird das Plasmid *pNCO-AA-BglII-LuSy* erhalten.

D) Die Überprüfung der Expressionsrate bzw. der Größe des monomeren Proteinstranges erfolgte analog Beispiel 1 M). Im Rohextrakt des Stammes XL1-pNCO-AA-BglII-LuSy konnte eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 16,7 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne pNCO-AA-BglII-LuSy-Expressionsplasmid nicht zu sehen war. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca. 20 % bezogen auf alle löslichen Proteine (geschätzt).

E) Die weitere Analytik wurde gemäß Beispiel 20 O) bis R) durchgeführt, wobei keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp-Enzym (AA-LuSy) zu beobachten waren.

Beispiel 26

Herstellung eines Vektors zur C-terminalen Fusion von Fremdpeptiden an die Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*

A) Das Gen für die Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* wurde mit den Oligonukleotiden EcoRI-RBS-2 (siehe Beispiel 2 A)) und AQUI-10-(BamHI) (5' tat tat gga tcc tcg gag aga ctt gaa taa gtt tgc 3'), welches am 3'-Ende komplementär zum 3'-Ende der Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* ist und unmittelbar hinter dem letzten kodierenden Basentriplett eine singuläre Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease BamHI (G*GATCC) einführt (das, in der ursprünglichen Sequenz enthaltene Stopcodon wird aufgelöst: als neues Stopcodon dient ein, in der Vektorsequenz vorhandenes Stopcodon),

aus dem Plasmid pNCO-AA-LuSy amplifiziert. Die PCR wurde analog Beispiel 1 A) durchgeführt.

B) Die Reinigung des PCR-Ansatzes erfolgte gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 507 bp erhalten wurde.

C) Die weitere Vorgehensweise erfolgte analog Beispiel 1 B), E) bis L). Es wird das Plasmid *pNCO-AA-LuSy-(BamHI)* erhalten.

D) Die Überprüfung der Expressionsrate bzw. der Größe des monomeren Proteinstranges erfolgte analog Beispiel 1 M). Im Rohextrakt des Stammes XL1-pNCO-AA-LuSy-(BamHI) konnte eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 17,8 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne pNCO-AA-LuSy-(BamHI)-Expressionsplasmid nicht zu sehen war. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca. 20 % bezogen auf alle löslichen Proteine (geschätzt).

E) Die weitere Analytik wurde gemäß Beispiel 20 O) bis R) durchgeführt, wobei keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp-Enzym (AA-LuSy) zu beobachten waren.

Beispiel 27

Herstellung eines Vektors zur gleichzeitigen N- und C-terminalen Fusion von Fremdpeptiden an die Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*

A) Das Gen für die Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* wurde mit den Oligonukleotiden EcoRI-RBS-2 (siehe Beispiel 2 A)) und AQUI-10-(BamHI) (siehe Beispiel 26), aus dem Plasmid pNCO-AA-BglIII-LuSy amplifiziert. Die PCR wurde analog Beispiel 1 A) durchgeführt.

B) Die Reinigung des PCR-Ansatzes erfolgte gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 507 bp erhalten wurde.

C) Die weitere Vorgehensweise erfolgte analog Beispiel 1 B), E) bis L). Es wird das Plasmid *pNCO-AA-BglIII-LuSy-(BamHI)* erhalten.

D) Die Überprüfung der Expressionsrate bzw. der Größe des monomeren Proteinstranges erfolgte analog Beispiel 1 M). Im Rohextrakt des Stammes XL1-pNCO-AA-BglIII-LuSy-(BamHI) konnte eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 17,8 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne pNCO-AA-BglIII-LuSy-(BamHI)-Expressionsplasmid nicht zu sehen war. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca. 20 % bezogen auf alle löslichen Proteine (geschätzt).

E) Die weitere Analytik wurde gemäß Beispiel 20 O) bis R) durchgeführt, wobei keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp-Enzym (AA-LuSy) zu beobachten waren.

Literatur

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, David J. Lipman (1997)

Gapped BLAST and Psi-BLAST: a new generation of protein database search programs

Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402

Bacher A. and R. Ladenstein (1991)

The lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis* in Chemistry and Biochemistry of Flavoproteins, Band 1 (F. Müller, ed.) CRC Press, Boca Raton. 293-316

Bacher A., H. C. Ludwig, H. Schnepple and Y. Ben-Shaul (1986)

Heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. Quaternary structure and reaggregation.

J. Mol. Biol., 187, 75-86

Bacher A., H. Schnepple, B. Mailänder, M. K. Otto and Y. Ben-Shaul (1980)

Structure and function of the riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis* in Flavins and Flavoproteins, (K. Yagi and T. Yamano, eds.) Japan Scientific Societies Press, 579-586

Bacher A., S. Eberhardt, M. Fischer, S. Mörtl, K. Kis, K. Kugelbrey, J. Scheuring and K. Schott (1997)

Biosynthesis of riboflavin. Lumazine synthase and riboflavin synthase Methods Enzymol., 280, 389-399

Birnboim H.C., J. Doly (1979)

A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA Nucl. Acids. Res., 7, 1513-1522

Bradford M. (1976)

A rapid and selective method for the quantitation of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding

Anal. Biochem.. 72, 248-254

Brigidi P., E. Rossi, M. Bertarini, G. Riccardi, D. Matteuzzi (1990)

Genetic transformation of intact cells of *Bacillus subtilis* by electroporation
FEMS Microbiology Letters, 67, 135-138

Bullock W.O., J.M. Fernandez, J.M. Short (1987)
XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with β -Galactosidase selection
BioTechniques, 5, 376-379

Clackson T., D. Güssow, P.T. Jones (1991)
General applications of PCR to gene cloning and manipulation
In: M.J. McPherson, P. Quirke, G.R. Taylor (eds.); PCR: A practical approach (187-214). Oxford Press

Cohn E. und Edsall J. (1943)
Proteins, amino acids and peptides as ions and dipolar ions
Reinhold, New York

Compton S.J., C.G. Jones (1985)
Mechanism of Dye Response and Interference in the Bradford Protein Assay
Annal. Biochem., 151, 369

Cronan J.E. (1990)
Biotination of proteins in vivo
The Journal of biological Chemistry, 265/18, 10327-10333

Dalsgaard K., Utenthal A., Jones T., Xu F., Merryweather A., Hamilton W., Langeveld J., Boshuizen R., Kamstrup S., Lomonosoff G., Porta C., Vela C., Casal J., Meloen R., Rodgers P. (1997)
Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease
Nature Biotechnology, Volume 15, 248-252

Davis L.G., M.D. Dibner, J.F. Battey (1986)
Basic Methods in molecular biology
Elsevier, New York, Amsterdam, London

Deckert G., Warren P., Gaasterland T., Young W., Lenox A., Graham D., Overbeek R., Snead M., Keller M., Aujay M., Huber R., Feldman R., Short J., Olsen G., Swanson R. (1998)
The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*
Nature, 392, 353-358

Dower W.J., J.F. Miller, C.W. Ragsdale (1988)

High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation
Nucl. Acids Res., 16, 6127-6145

Glick B. R., Pasternak J.J. (1995)
Molekulare Biotechnologie
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

Grosjean H. und W. Fiers (1982)
Preferential codon usage in prokaryotic genes-the optimal codon-anticodon interaction
energy and the selective codon usage in efficiently expressed genes
Gene, 18, 199-209

Hennecke H., Günther I., Binder F. (1982)
A novel cloning vector for the direct selection of recombinant DNA in *Escherichia coli*
Gene, 19, 231-234

Henner D. (1990)
Expression of Heterologous Genes in *Bacillus subtilis*
Meth. Enzymol., 185, 199

Ikemura T. (1981)
Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the
occurrence of the respective codons in 1st protein genes: A proposal for a synonymous
codon choice that is optimal for the *E. coli* translational system
J. Mol. Biol., 151, 389-409

Ladenstein R., B. Meyer, R. Huber, H. Labischinski, K. Bartels, H.-D. Bartunik, L. Bach-
mann, H. C. Ludwig and A. Bacher (1986)
Heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. Particle dimensions, crystal packing
and molecular symmetry.
J. Mol. Biol., 187, 87-100

Ladenstein R., H. D. Bartunik, M. Schneider, R. Huber, K. Schott and A. Bacher (1986)
Structure of the riboflavin synthase/lumazine synthase complex. Arrangement and
chain folding of β subunits in the icosahedral capsid.
in Chemistry and Biology of Pteridines, (B. A. Cooper, V. M. Whitehead, eds.) Walter
de Gruyter, Berlin, 103-106

Ladenstein R., K. Ritsert, R. Huber, G. Richter and A. Bacher (1994)
The lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*: X-ray

structure analysis of reconstituted β_{60} capsids at 3.2 Å resolution
Eur. J. Biochem., 223, 1007-1017

Ladenstein R., M. Schneider, R. Huber, H. D. Bartunik, K. Wilson, K. Schott and A. Bacher (1988)
Heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. Crystal structure analysis of the icosahedral β_{60} capsid at 3.3 Å resolution
J. Mol. Biol., 203, 1045-1070

Ladenstein R., M. Schneider, R. Huber, K. Schott and A. Bacher (1988)
The structure of the icosahedral β_{60} capsid of heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*
Z. Kristallographie, 185, 122-124

Laemmli U.K. (1970)
Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4
Nature, 227, 680-685

Laue T., Shah B., Ridgeway T., Pelletier S. (1992)
Computer aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins
in: Harding S., Rowe A., Horton J. (eds.) Analytical ultracentrifugation in biochemistry and polymer science
Royal society of chemistry, Cambridge, 90-125

LeGrice S.F.J. (1990)
A regulated promotor for high level expression of heterologous genes in *Bacillus subtilis*
Meth. Enzymol., 185, 201

Liddell E., Weeks I. (1996)
Antikörpertechniken
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

Lottspeich F., Zorbas H. (1998)
Bioanalytik
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

Lovett P.S. (1981)
BR151ATCC 33677 - *Bacillus subtilis* BR151
J. Bacteriol., 146, 1162-1165

Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1982)

Molecular cloning: A laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

Modrow S., Falke D. (1997)
Molekulare Virologie
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

Mörzl S., M. Fischer, G. Richter, J. Tack, S. Weinkauf and A. Bacher (1996)
Biosynthesis of riboflavin. Lumazine synthase of *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem., 271, 33201-33207

Mullis K., F. Falooma, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Ehrlich (1986)
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction
Cold Spring Harbor Symp., 51, 263-273

Perkins J.B., J.G. Pero, A. Sloma (1991)
Riboflavin overproducing bacteria expressing the rib-operon of *Bacillus*
Eur. Pat. Appl. EP 405370 A1 910102

Read S.M., D.H. Northcote (1981)
Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie Blue
G dyebinding assay for protein
Anal. Biochem., 116, 53-64

Sambrook J., E. Fritsch, T. Maniatis (1989)
Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

Sanger F., S. Nicklen, A.R. Coulson (1977)
DNA sequencing with chain terminating inhibitors
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467

Schatz P.J. (1993)
Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying
enzyme: a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in *Escherichia coli*
Bio/Technology, Oct; 11(10), 1138-1143

Sgamarella V., J.H. van de Sande, H.G. Khorana (1979)
Studies on the polynukleotides. C. A novel joining reaction catalysed by the T4-
polynukleotide-ligase
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 67, 1468-1475

Stüber D., H. Matile, G. Garotta (1990)

System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: Application to epitope mapping, preparation of antibodies and structure-function analysis

in: Lefkovits, I., P. Pernis (eds.) Immunological Methods, IV, 121-152

Tucker J., Grisshammer (1996)

Purification of a rat neurotensin receptor expressed in *Escherichia coli*
Biochem. Journal, 317, 891-899

Wada K., Wada Y., Ishibashi F., Gojobori T., Ikemura T. (1992)

Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data.
Nucleic Acid Res., 20, 2111-2118

Winnacker E.L. (1990)

Gene und Klone. Eine Einführung in die Gentechnologie
Verlag Chemie, Weinheim, Dearfield Beach, Basel

Zamenhof P.J., M. Villarejo (1972)

Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting α -complementation
of β -galactosidase fragments in vivo
J. Bacteriol., 110, 171-178

Patentansprüche

1. Protein-Konjugat, bestehend aus mindestens einem Funktionsbereich an einer beliebigen Position der Sequenz eines Trägerproteinbereichs zur Ausbildung einer Kapsid-Raumstruktur vom Lumazinsynthase-Typ, so daß deren Außenperipherie mit einer Vielzahl dieser Funktionsbereiche kovalent verknüpft ist.
2. Rekombinant herstellbares Protein-Konjugat, bestehend aus mindestens einem Funktionsproteinbereich am N-Terminus und/oder C-Terminus und/oder inseriert in eine Schleifenregion der Sequenz eines Trägerproteinbereichs zur Ausbildung einer Kapsid-Raumstruktur vom Lumazinsynthase-Typ, so daß deren Außenperipherie mit einer Vielzahl der Funktionsproteinbereiche kovalent verknüpft ist.
3. Protein-Konjugat nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Trägerproteinbereich eine Aminosäuresequenz - ausgewählt aus einer Sequenzmenge - aufweist, die sich dadurch ergibt, daß man für jede Aminosäureposition in der Sequenz einer vorbestimmten nativen Lumazinsynthase eine Aminosäure oder eine Deletion aus der entsprechenden Position eines Alignments der vorbestimmten Lumazinsynthase-Sequenz mit mindestens einer nativen Lumazinsynthase-Sequenz eines anderen Organismus auswählt.
4. Protein-Konjugat nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Trägerproteinbereich die Sequenz einer nativen Lumazinsynthase aufweist.
5. Protein-Konjugat nach Anspruch 1 und 2 dadurch gekennzeichnet, daß der Trägerproteinbereich die Sequenz einer thermostabilen nativen Lumazinsynthase aufweist.
6. Protein-Konjugat nach Anspruch 1 und 2 dadurch gekennzeichnet, daß die

thermostabile native Lumazinsynthase die Proteinsequenz der Lumazinsynthase aus einem hyperthermophilen Mikroorganismus, insbesonders aus *Aquifex aeolicus* aufweist.

7. Protein-Konjugat nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Trägerproteinbereich aus einer Mischsequenz bestehend aus den Aminosäurenpositionen 1 - 60 der nativen Lumazinsynthase aus einem mesophilen Organismus, bezogen auf *Bacillus subtilis*, und den Aminosäurenpositionen 61 - 154 der nativen Lumazinsynthase aus einem hyperthermophilen Mikroorganismus, bezogen auf *Aquifex aeolicus*, aufgebaut ist.
8. Protein-Konjugat nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Trägerproteinbereich aus einer beliebigen Sequenz besteht, wobei die Hauptkette dieser Sequenz in α -Helix und β -Faltblatt-Motiven faltet, wobei 4 β -Segmente ein paralleles, zentrales 4-strängiges β -Faltblatt bilden und wobei das zentrale 4-strängige β -Faltblatt auf beiden Seiten von jeweils 2 α -Helices flankiert wird, so daß sich 5 Einheiten dieser α - β Motive zu einer pentameren Struktur zusammenlagern, wobei der N-Terminus einer jeden Einheit in der benachbarten Einheit das fünfte β -Segment zum zentralen 4-strängigen β -Faltblatt bilden kann, wobei 12 dieser pentameren Unterstrukturen sich zusammenlagern und die ikosaedrische Struktur einer Lumazinsynthase bilden und die N- und C-Termini der beliebigen Sequenz mit den oben beschriebenen Strukturmerkmalen sich an der Oberfläche des gebildeten Ikosaeders befinden, und wobei die beliebige Sequenz vorzugsweise aus dem Vergleich einer Sequenzmenge verschiedener, d.h. aus verschiedenen Organismen stammenden Lumazinsynthasesequenzen, insbesondere unter Verwendung von Suchalgorithmen nach Altschul et al. (1997), gewonnen werden.
9. Protein-Konjugat nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Trägerproteinbereich eine Sequenz einer nativen Lumazinsynthase aufweist,

bei der mindestens eine Cysteineinheit durch eine andere Aminosäure ausgetauscht oder deletiert ist oder chemisch modifiziert ist.

10. Protein-Konjugat nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß eine Cysteineinheit an einer der Position 93 und/oder der Position 139 der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* entsprechenden Position deletiert ist oder gegen eine andere Aminosäure, vorzugsweise Serin, ausgetauscht ist.
11. Protein-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Trägerproteinbereich und der Funktionsproteinbereich über ein Linkerpeptid miteinander verknüpft sind.
12. Protein-Konjugat nach einem der Ansprüche 2 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß der Funktionsproteinbereich die Sequenz einer Dihydrofolatreduktase, eines Maltose-bindenden Proteins, eines *in vivo* biotinylierbaren Peptids, eines Antigen-wirksamen Peptids, insbesondere aus einem Oberflächenprotein eines Virus, eines durch einen monoklonalen Antikörper erkennbaren Peptids, eines zufällig generierten Peptids, oder eine chemisch derivatisierbare Aminosäure, beispielsweise Cystein oder Lysin ist.
13. Protein-Konjugat nach einem der Ansprüche 2 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Trägerproteinbereich chemisch modifiziert ist.
14. Protein-Konjugat nach einem der Ansprüche 2 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Funktionsproteinbereich chemisch modifiziert, vorzugsweise biotinyliert ist.
15. Heterooligomeres Protein-Konjugat bestehend aus Mischungen von mindestens zwei unterschiedlichen Protein-Konjugaten nach einem der Ansprüche 1 bis 14 oder von mindestens einem Protein-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 14 und mindestens einem Trägerproteinbereich ohne Funktionsproteinbereich mit einer Sequenz gemäß einem der Ansprüche 3

bis 8, wobei die einzelnen Proteine gegebenenfalls durch chemische Behandlung miteinander kovalent verknüpft sind.

16. Verfahren zur Herstellung eines Protein-Konjugats nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte,
 - a) Isolierung einer Lumazinsynthase aus einem Wild-Typ oder einem rekombinanten Organismus (Trägerprotein);
 - b) Chemische Kopplung von Funktionsmolekülen an das Trägerprotein;
 - c) Reinigung des Protein-Konjugats.
17. Verfahren zur Herstellung eines Protein-Konjugats oder eines heterooligomeren Proteins nach einem der Ansprüche 2 bis 14, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte,
 - a) Herstellung einer ersten DNA, die für den Trägerproteinbereich kodiert;
 - b) das Fusionieren von mindestens einer zweiten DNA, die für den Funktionsbereich und gegebenenfalls für das Linkerprotein kodiert mit dem 5'-Ende und/oder dem 3'-Ende der ersten DNA und/oder Inserieren der zweiten DNA in einem für eine Schleifenregion des Trägerproteinbereichs kodierenden Region der ersten DNA unter Bildung einer artifiziellen DNA.;
 - c) Umwandlung der artifiziellen DNA der Stufe b) in ein Expressionsplasmid;
 - d) Transformation von Wirtszellen mit einem oder mehreren der in Stufe c) erhaltenen Expressionsplasmiden;
 - e) Expression der artifiziellen DNA in den transformierten Wirtszellen unter Bildung eines Proteinkonjugats, gegebenenfalls unter der Einführung einer vorbestimmten posttranslationalen Modifikation des Protein-Konjugats in vivo, vorzugsweise durch Phosphorylierung, Glycosylierung oder Biotinylierung;
 - f) Reinigung des Protein-Konjugats;
 - g) gegebenenfalls Modifizierung des Protein-Konjugats durch chemische Kopplung von Aminosäurenresten auf der Proteinoberfläche einer aus dem Protein-Konjugat gebildeten Kapsid-Raumstruktur mit frei bestimmbaren Kopplungspartnern.

18. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß man ein heterooligomeres Protein herstellt durch
 - a) Mischen verschiedener, gemäß Anspruch 16, Stufe c) und/oder Anspruch 17, Stufe f) gewonnener Protein-Konjugate;
 - b) Denaturierung der erhaltenen Mischung und c) Renaturierung der Mischung; oder durch
 - a₂) Denaturierung verschiedener, gemäß Anspruch 16, Stufe c) und/oder Anspruch 17, Stufe i) gewonnener Protein-Konjugate,
 - b₂) Mischung der denaturierten Protein-Konjugate ,
 - c₂) Renaturierung der Mischung.
19. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß man Protein-Konjugate einsetzt, die unter Verwendung eines faltungsunterstützenden Liganden hergestellt wurden.
20. Vektoren zur Herstellung der Protein-Konjugate nach einem der Ansprüche 2 bis 14.
21. DNA, die für ein Protein gemäß Anspruch 20 kodiert.
22. Protein, bestehend aus der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, gekennzeichnet dadurch, daß die Aminosäure Cystein an Position 93 gegen die Aminosäure Serin ausgetauscht ist.
23. Protein, bestehend aus der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, gekennzeichnet dadurch, daß die Aminosäure Cystein an Position 139 gegen die Aminosäure Serin ausgetauscht ist.
24. Protein, bestehend aus der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, gekennzeichnet dadurch, daß die Aminosäure Cystein an den Positionen 93 und 139 gegen die Aminosäure Serin ausgetauscht ist.

25. An die Kodon-Verwendung von *Escherichia coli* angepasste DNA zur Herstellung der Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* in einem rekombinanten *Escherichia coli* - Stamm.
26. Protein, bestehend aus der Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*, zur Verwendung als Trägerprotein gemäß Anspruch 1.
27. Chimäres Protein, bestehend aus den Aminosäuren 1-60 der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* und den Aminosäuren 61-154 der Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*, zur Verwendung als Trägerprotein gemäß Anspruch 1.
28. Vektor zur Herstellung von Protein-Konjugaten nach Anspruch 12, gekennzeichnet dadurch, daß sich der Funktions-DNA-Anteil am 5'-Ende des Trägerproteingens vom Lumazinsynthase-Typs befindet, wobei das fusionierte Gen für ein artefizielles Protein kodiert, welches einen Funktionsproteinbereich, einen Trägerproteinbereich zur Ausbildung einer Kapsid-Raumstruktur vom Lumazinsynthase-Typ und optional ein Linkerpeptid enthält, und wobei der Funktionsproteinbereich und das Linkerpeptid sich am N-Terminus des Trägerproteinbereichs befinden, und wobei der Vektor folgende Bestandteile enthält:
 - a) ein DNA-Fragment, kodierend für einen Trägerproteinbereich zur Ausbildung einer Kapsid-Raumstruktur vom Lumazinsynthase-Typ ;
 - b) ein DNA-Fragment, kodierend für einen beliebigen Funktionsproteinbereich;
 - c) optional: ein DNA-Fragment kodierend für ein Linkerpeptid.
29. Ein Vektor nach Anspruch 28, gekennzeichnet dadurch, daß er das Gen für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, kodierend für den Trägerproteinbereich, das Gen für die Dihydrofolatreduktase aus *Escherichia coli*, kodierend für den Funktionsproteinbereich und als Linkerpeptid ein DNA-Fragment kodierend für ein Tripeptid bestehend aus der Aminosäure Alanin

enthält.

30. Ein Vektor nach Anspruch 28, gekennzeichnet dadurch, daß er das Gen für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, kodierend für den Trägerproteinbereich, das Gen für das 'Maltose bindende Protein' aus *Escherichia coli*, kodierend für den Funktionsproteinbereich und als Linkerpeptid ein DNA-Fragment, kodierend für die Aminosäuresequenz SNNNNNNNNNLGIEGRISEFAAA enthält.
31. Vektor zur Herstellung von Protein-Konjugaten nach Anspruch 12, gekennzeichnet dadurch, daß sich der Funktions-DNA-Anteil am 3'-Ende des Trägerproteinengens vom Lumazinsynthase-Typs befindet, und wobei das fusionierte Gen für ein artefizielles Protein kodiert, welches einen Funktionsproteinbereich, einen Trägerproteinbereich zur Ausbildung einer Kapsid-Raumstruktur vom Lumazinsynthase-Typ, und optional ein Linkerpeptid enthält, und wobei der Funktionsproteinbereich und das Linkerpeptid sich am C-Terminus des Trägerproteinbereichs befindet, und wobei der Vektor folgende Bestandteile enthält:
 - a) ein DNA-Fragment, kodierend für einen Trägerproteinbereich zur Ausbildung einer Kapsid-Raumstruktur vom Lumazinsynthase-Typ (jeweils ohne Stop-Codon);
 - b) ein DNA-Fragment, kodierend für einen beliebigen Funktionsproteinbereich;
 - c) optional: ein DNA-Fragment kodierend für ein Linkerpeptid.
32. Vektor nach Anspruch 31, gekennzeichnet dadurch, daß er das Gen für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, kodierend für den Trägerproteinbereich, das Gen für die Dihydrofolatreduktase aus *Escherichia coli*, kodierend für den Funktionsproteinbereich und als Linkerpeptid ein DNA-Fragment kodierend für die Aminosäuresequenz LAAAGGGG enthält.
33. Vektor nach Anspruch 31, gekennzeichnet dadurch, daß er das Gen für die

Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* (gemäß Anspruch 25) kodierend für den Trägerproteinbereich und ein Genfragment, kodierend für den Funktionsproteinbereich mit der Aminosäuresequenz GSVDLQPSLIS enthält. Der Vektor verfügt über eine singuläre Erkennungssequenz am 5'-Ende der Gensequenz des Trägerproteins für die Restriktionsendonuklease BgIII, wobei diese Schnittstelle für eine Fusion von Fremdgenen an das 5'-Ende der Lumazinsynthase genutzt werden kann.

34. Vektor zur Herstellung von Protein-Konjugaten nach Anspruch 12, gekennzeichnet dadurch, daß sich der Funktions-DNA-Anteil am 3'-Ende des Trägerproteingens vom Lumazinsynthase-Typs befindet, wobei das fusionierte Gen für ein artefizielles Protein kodiert, welches einen Funktionsproteinbereich, einen Trägerproteinbereich zur Ausbildung einer Kapsid-Raumstruktur vom Lumazinsynthase-Typ, und optional ein Linkerpeptid enthält, und wobei der Funktionsproteinbereich und das Linkerpeptid sich am C-Terminus des Trägerproteinbereichs befindet, und wobei der Funktionsproteinbereich *in vivo* biotinyliert wird und wobei der Vektor folgende Bestandteile enthält:
 - a) ein DNA-Fragment, kodierend für einen Trägerproteinbereich zur Ausbildung einer Kapsid-Raumstruktur vom Lumazinsynthase-Typ (jeweils ohne Stop-Codon);
 - b) ein DNA-Fragment kodierend für ein biotinylierbares Peptid mit der Sequenz LGGIFEAMKMEWR, wobei die Aminosäure Lysin *in vivo* biotinyliert wird;
 - c) optional: ein DNA-Fragment, kodierend für ein Linkerpeptid.
35. Ein Vektor nach Anspruch 34, gekennzeichnet dadurch, daß er das Gen für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, kodierend für den Trägerproteinbereich, und als Linkerpeptid ein DNA-Fragment, kodierend für ein Tripeptid bestehend aus der Aminosäure Alanin enthält.
36. Ein Vektor nach Anspruch 34, gekennzeichnet dadurch, daß er das an die

Kodon-Verwendung von *Escherichia coli* angepasste Gen, kodierend für die Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* nach Anspruch 25 als Trägerproteinbereich, und als Linkerpeptid ein DNA-Fragment, kodierend für ein Tripeptid bestehend aus der Aminosäure Alanin enthält.

37. Ein Vektor nach Anspruch 34, gekennzeichnet dadurch, daß er das an die Kodon-Verwendung von *Escherichia coli* angepasste Gen, kodierend für die Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* nach Anspruch 25 als Trägerproteinbereich, und als Linkerpeptid ein DNA-Fragment, kodierend für Peptid, bestehend aus der Aminosäurensequenz HHHAAA enthält.
38. Ein Vektor nach Anspruch 34 gekennzeichnet dadurch, daß er das an die Kodon-Verwendung von *Escherichia coli* angepasste Gen, kodierend für die Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* nach Anspruch 25 als Trägerproteinbereich, und als Linkerpeptid ein DNA-Fragment, kodierend für Peptid, bestehend aus der Aminosäurensequenz HHHHHGGSGAAA enthält.
39. Vektor zur Produktion eines Protein-Konjugates nach Anspruch 12, gekennzeichnet dadurch, daß sich der Funktions-DNA-Anteil am 5'-Ende des Lumazinsynthasegens aus *Bacillus subtilis* befindet, wobei der Funktions-DNA-Anteil für ein antigen wirksames Peptid aus dem VP2-Oberflächenprotein des 'Mink enteritis Virus' kodiert und das fusionierte Gen für ein artefizielles Protein kodiert, welches einen Funktionsproteinanteil und einen Trägerproteinanteil enthält und wobei der Funktionsproteinanteil sich am N-Terminus der Lumazinsynthase befindet und wobei der Vektor folgende Bestandteile enthält:
 - a) Lumazinsynthasegen aus *Bacillus subtilis*;
 - b) Peptidkodierende DNA am 5'-Ende des Lumazinsynthasegens. Das Fremdpeptid besitzt die Sequenz MGDGAVQPDGGQPAVRNER
40. Vektor zur Produktion eines Protein-Konjugates nach Anspruch 12

gekennzeichnet dadurch, daß sich der Funktions-DNA-Anteil am 3'-Ende des Lumazinsynthasegens aus *Bacillus subtilis* befindet, wobei der Funktions-DNA-Anteil für ein antigen wirksames Peptid aus dem VP2-Oberflächenprotein des 'Mink enteritis Virus' kodiert und wobei das fusionierte Gen für ein artefizielles Protein kodiert, welches einen Funktionsproteinanteil und einen Trägerproteinanteil enthält, wobei der Funktionsproteinanteil sich am C-Terminus der Lumazinsynthase befindet und wobei der Vektor folgende Bestandteile enthält:

- a) Lumazinsynthasegen aus *Bacillus subtilis* (ohne Stop-Codon),
- b) Peptidkodierende DNA am 3'-Ende des Lumazinsynthasegens. Das Fremdpeptid besitzt die Sequenz GDGAVQPDGGQPAVRNER.

41. Vektor zur Produktion eines Protein-Konjugates nach Anspruch 12, gekennzeichnet dadurch, daß sich der Funktions-DNA-Anteil am 5'-Ende und am 3'-Ende des Lumazinsynthasegens aus *Bacillus subtilis* befindet und der Funktions-DNA-Anteil für ein antigen wirksames Peptid aus dem VP2-Oberflächenprotein des 'Mink enteritis Virus' kodiert und das fusionierte Gen für ein artefizielles Protein kodiert, welches einen Funktionsproteinanteil und einen Trägerproteinanteil enthält, und wobei der Funktionsproteinanteil sich sowohl am N-Terminus als auch am C-Terminus der Lumazinsynthase befindet und wobei der Vektor folgende Bestandteile enthält:

- a) Lumazinsynthasegen aus *Bacillus subtilis* (ohne Stop-Codon).
- b) Zwei peptidkodierende Sequenzen am 5'- und am 3'-Ende des Lumazinsynthasegens. Das Peptid am N-Terminus besitzt die Sequenz MGDGAVQPDGGQPAVRNER, das Peptid am C-Terminus die Sequenz GDGAVQPDGGQPAVRNER.

42. Vektor zur Produktion eines Protein-Konjugates nach Anspruch 12 gekennzeichnet dadurch, daß sich der Funktions-DNA-Bereich am 5'-Ende des Lumazinsynthasegens aus *Bacillus subtilis* befindet und der Funktions-DNA-Anteil für ein Oktapeptid (FLAG-Peptid) kodiert, welches durch einen monoklonalen Antikörper (vorzugsweise Anti-FLAG-M2; IBI E.coli FLAG®

Expression System, Integra Biosciences, Fernwald) erkannt wird, wobei das fusionierte Gen für ein artefizielles Protein kodiert, welches einen Funktionsproteinbereich und einen Trägerproteinbereich enthält und wobei sich der Funktionsproteinbereich am N-Terminus der Lumazinsynthase befindet und wobei der Vektor folgende Bestandteile enthält:

- a) Lumazinsynthasegen aus *Bacillus subtilis*;
- b) Peptidkodierende DNA am 5'-Ende des Lumazinsynthasegens. Das Fremdpeptid besitzt die Sequenz MDYKDDDDK;
- c) DNA, kodierend für ein Linkerpeptid mit der Sequenz VKL.

43. Vektor zur Produktion eines Protein-Konjugates nach Anspruch 12, gekennzeichnet dadurch, daß sich der Funktions-DNA-Bereich am 3'-Ende des Lumazinsynthasegens aus *Bacillus subtilis* befindet, wobei der Funktions-DNA-Anteil für ein Hexapeptid (His-6Peptid) kodiert, welches durch einen monoklonalen Antikörper (vorzugsweise Penta-HisTM Antibody; Qiagen, Hilden) erkannt wird, und wobei das fusionierte Gen für ein artefizielles Protein kodiert, welches einen Funktionsproteinbereich und einen Trägerproteinbereich enthält, und wobei der Funktionsproteinbereich sich am C-Terminus der Lumazinsynthase befindet, und wobei der Vektor folgende Bestandteile enthält:

- a) Lumazinsynthasegen aus *Bacillus subtilis* ohne Stopkodon.
- b) Peptidkodierende DNA am 3'-Ende des Lumazinsynthasegens. Das Fremdpeptid besitzt die Sequenz HHHHHH.

44. Vektor zur Produktion eines Protein-Konjugates nach Anspruch 12, gekennzeichnet dadurch, daß sich der Funktions-DNA-Bereich am 3'-Ende des Lumazinsynthasegens aus *Bacillus subtilis* befindet, wobei der Funktions-DNA-Bereich für eine artefizielle Peptidsequenz kodiert, die mit der Aminosäure Lysin endet, wobei die Aminosäure Lysin zur chemischen Kopplung von Funktionsmolekülen an den Trägerproteinbereich verwendet werden (vgl. Anspruch 16 b) kann, und wobei der Funktionsproteinbereich als Linker (Tentakel-Linker) dient, und wobei das fusionierte Gen für ein

artefizielles Protein kodiert, welches einen Funktionsproteinbereich und einen Trägerproteinbereich enthält, wobei der Funktionsproteinbereich sich am C-Terminus des Trägerproteinbereichs befindet und wobei der Vektor folgende Bestandteile enthält:

- a) Lumazinsynthasegen aus *Bacillus subtilis*.
- b) Kodon für Lysin (aaa) am 3'-Ende der artifizielten DNA.
- c) DNA kodierend für ein Linkerpeptid mit der Sequenz GGGGSGGGSGG.

45. Vektor zur Produktion eines Protein-Konjugates nach Anspruch 12, gekennzeichnet dadurch, daß sich der Funktions-DNA-Bereich am 3'-Ende des Lumazinsynthasegens aus *Bacillus subtilis* befindet, wobei der Funktions-DNA-Bereich für eine artifizielle Peptidsequenz kodiert, die mit der Aminosäure Cystein endet, wobei die Aminosäure Cystein zur chemischen Kopplung von Funktionsmolekülen an den Trägerproteinbereich verwendet werden (vgl. Anspruch 16 b) kann, wobei der Funktionsproteinbereich als Linker (Tentakel-Linker) dient, und wobei das fusionierte Gen für ein artefizielles Protein kodiert, welches einen Funktionsproteinbereich und einen Trägerproteinbereich enthält und wobei der Funktionsproteinbereich sich am C-Terminus des Trägerproteinbereichs befindet, und wobei der Vektor folgende Bestandteile enthält:

- a) Lumazinsynthasegen aus *Bacillus subtilis* (ohne Stop-Codon).
- b) Kodon für Cystein (tgc) am 3'-Ende der artifiziellen DNA.
- c) DNA kodierend für ein Linkerpeptid mit der Sequenz GGGGSGGGSGG.

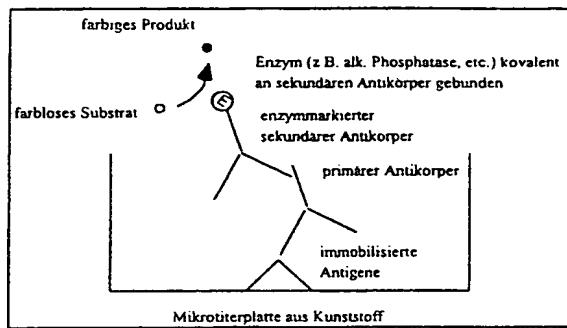
46. Protein-Konjugate nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Anwendung als Arzneistoff oder Impfstoff.

47. Verwendung der Protein-Konjugate nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Herstellung eines Arzneimittels oder eines Impfstoffs.

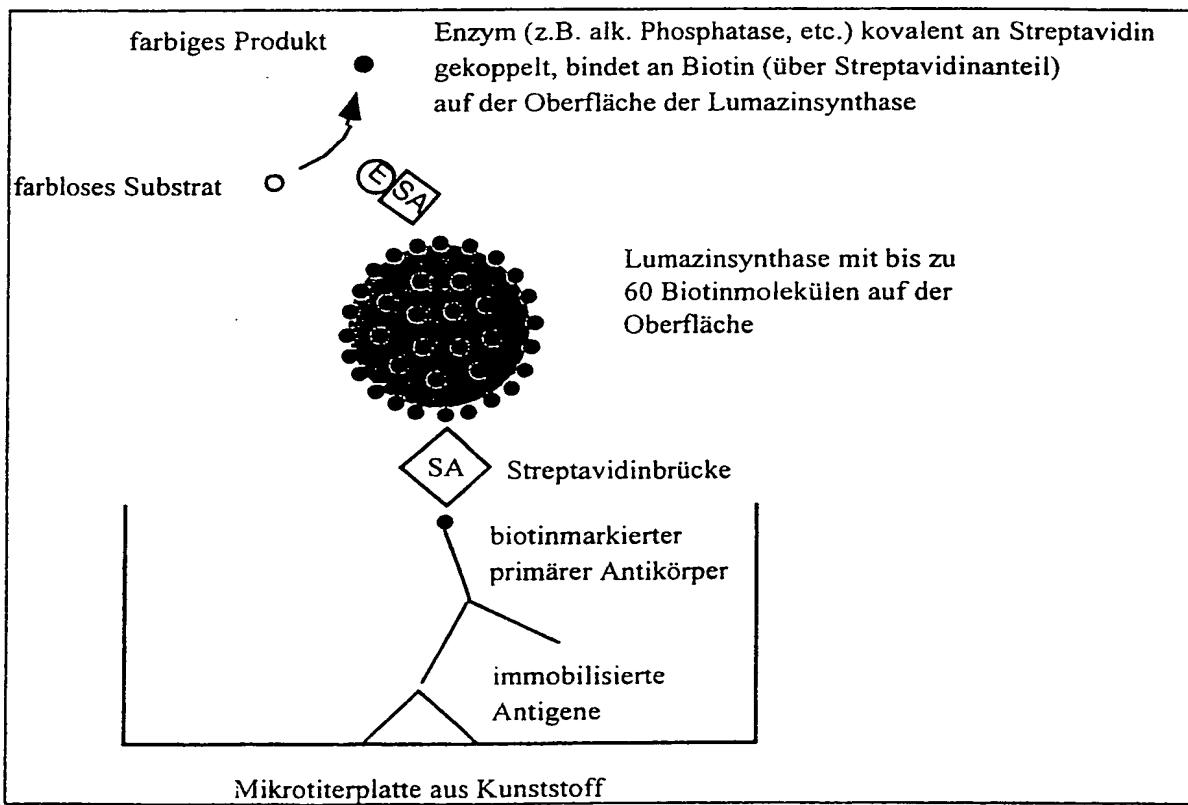
48. Verwendung der Protein-Konjugate nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Herstellung von diagnostisch oder therapeutisch verwendbaren Antikörpern.

49. Verwendung der Protein-Konjugate nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur selektiven Detektion von Antikörpern oder zur Reinigung von Antiköpergemischen oder zur Charakterisierung von Antikörpern.
50. Verwendung der Protein-Konjugate nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Herstellung von Proteinbibliotheken.
51. Arzneimittel, enthaltend eine pharmakologisch wirksame Menge eines Protein-Konjugats nach einem der Ansprüche 1 bis 15.
52. Impfstoff, enthaltend eine immunologisch wirksame Menge eines Protein-Konjugats nach einem der Ansprüche 1 bis 15.
53. Verwendung der Protein-Konjugate nach einem der Ansprüche 1 bis 15 als Biosensor.

Figuren

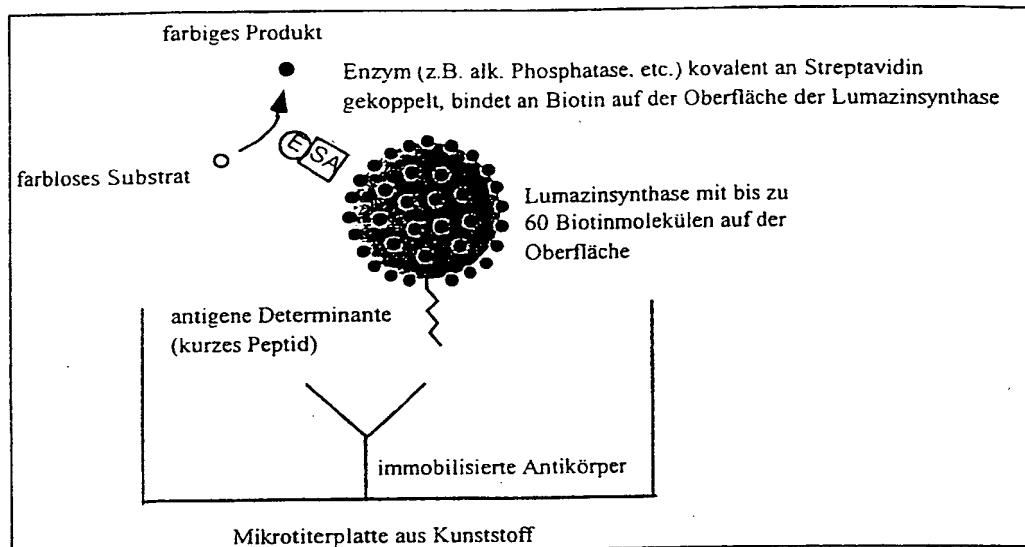


Figur 1

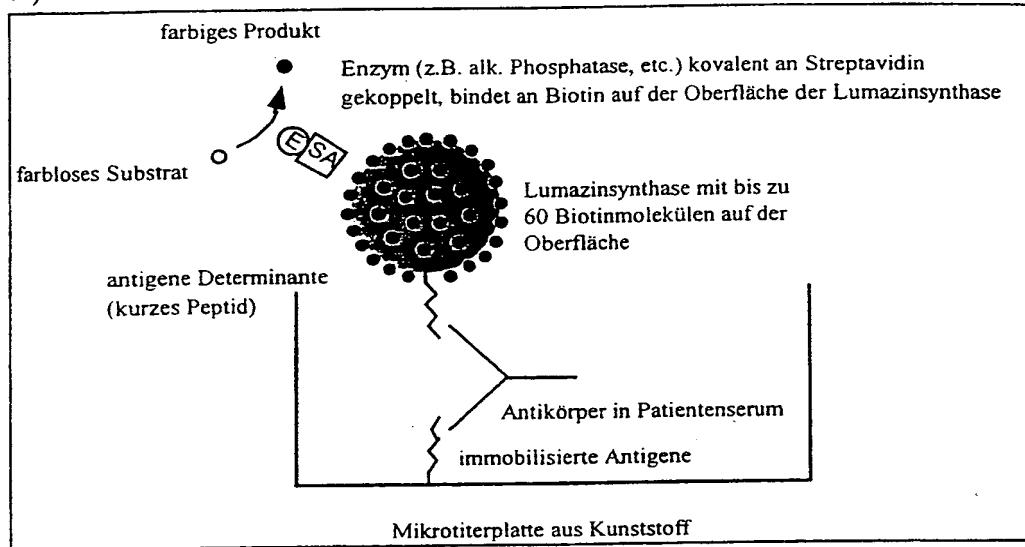


Figur 2

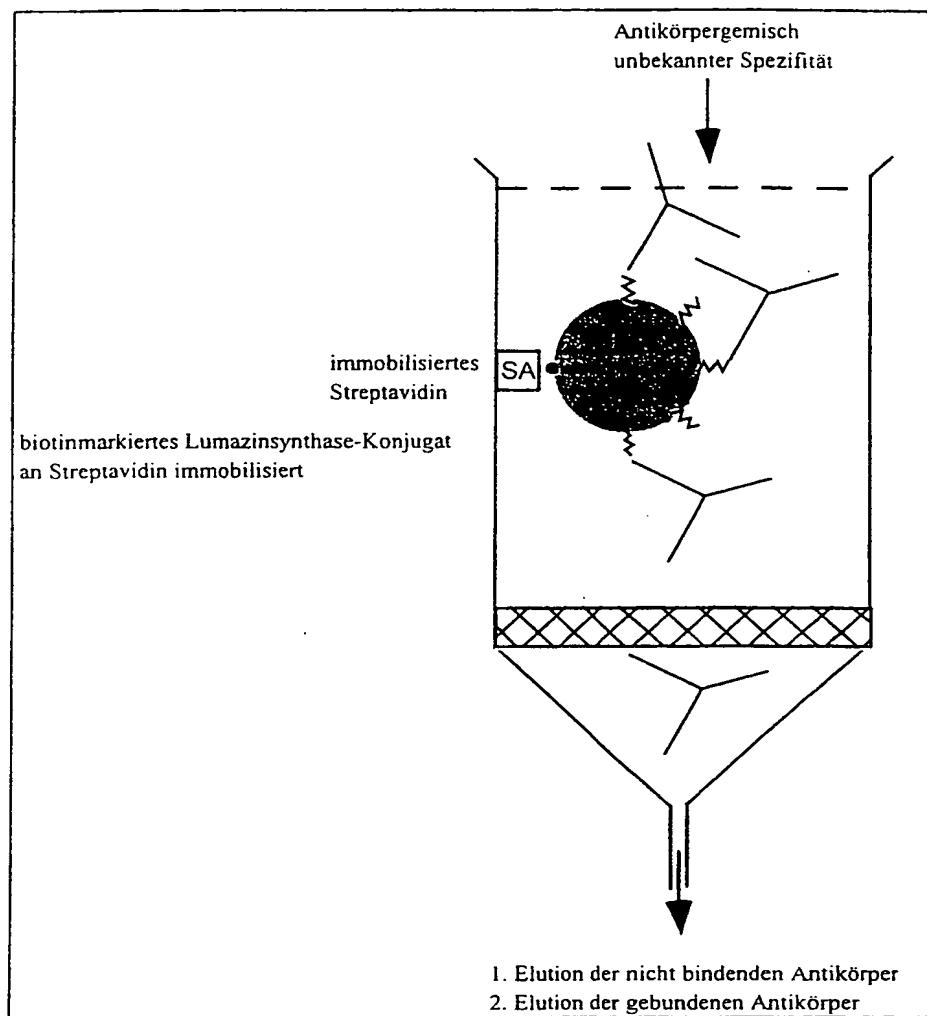
A)



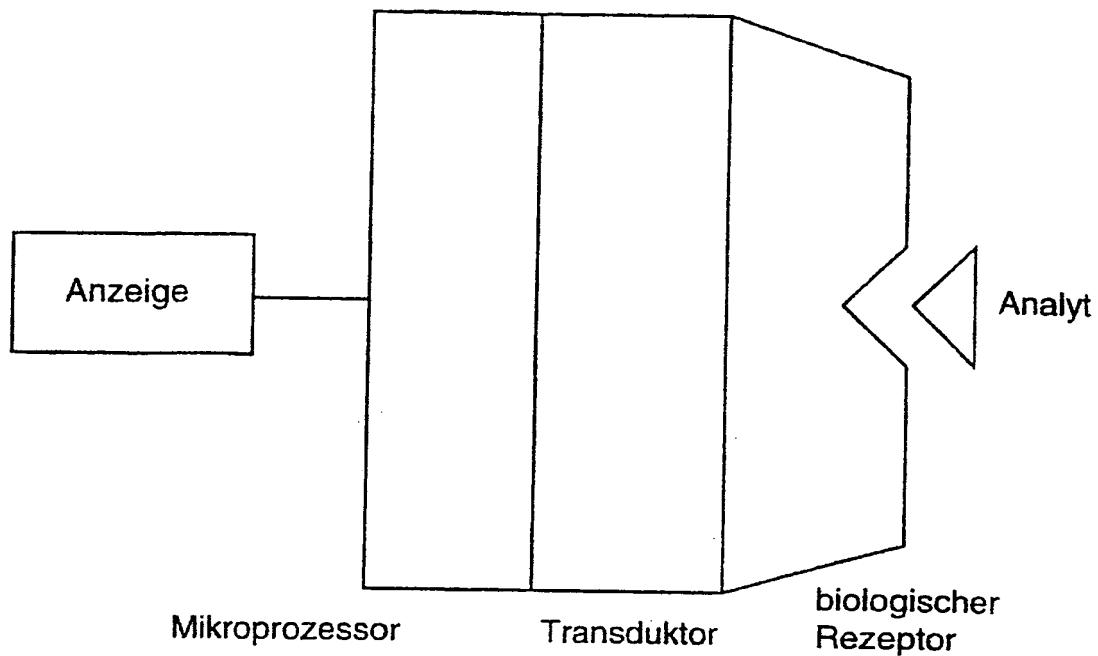
B)



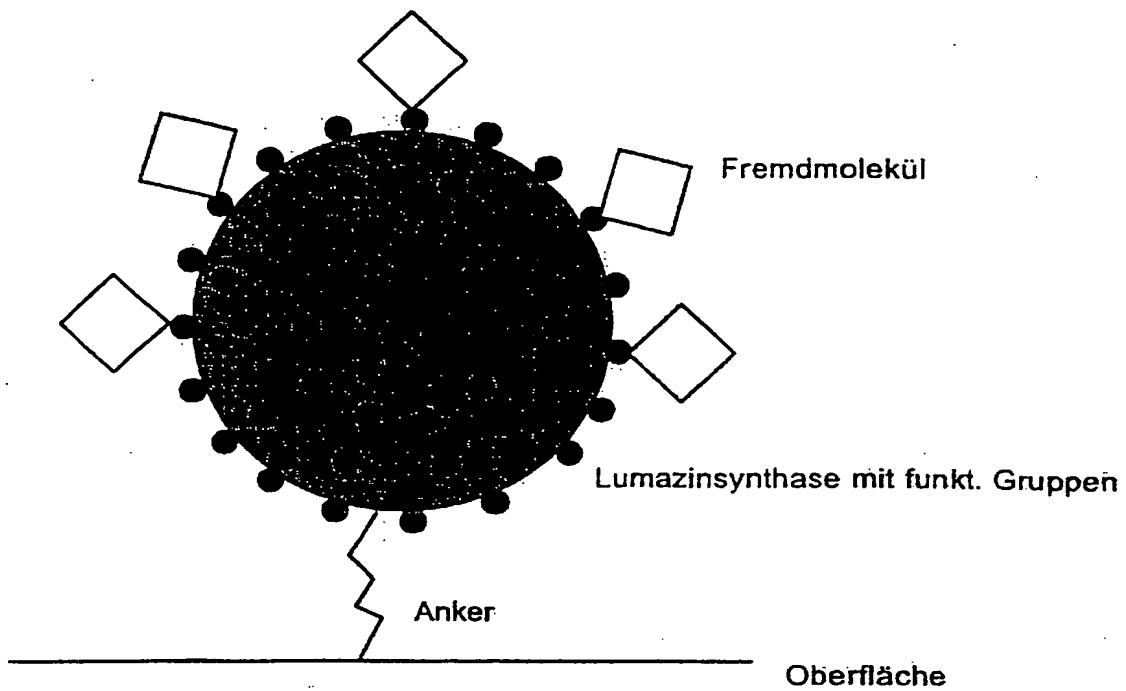
Figur 3



Figur 4



Figur 5



Figur 6

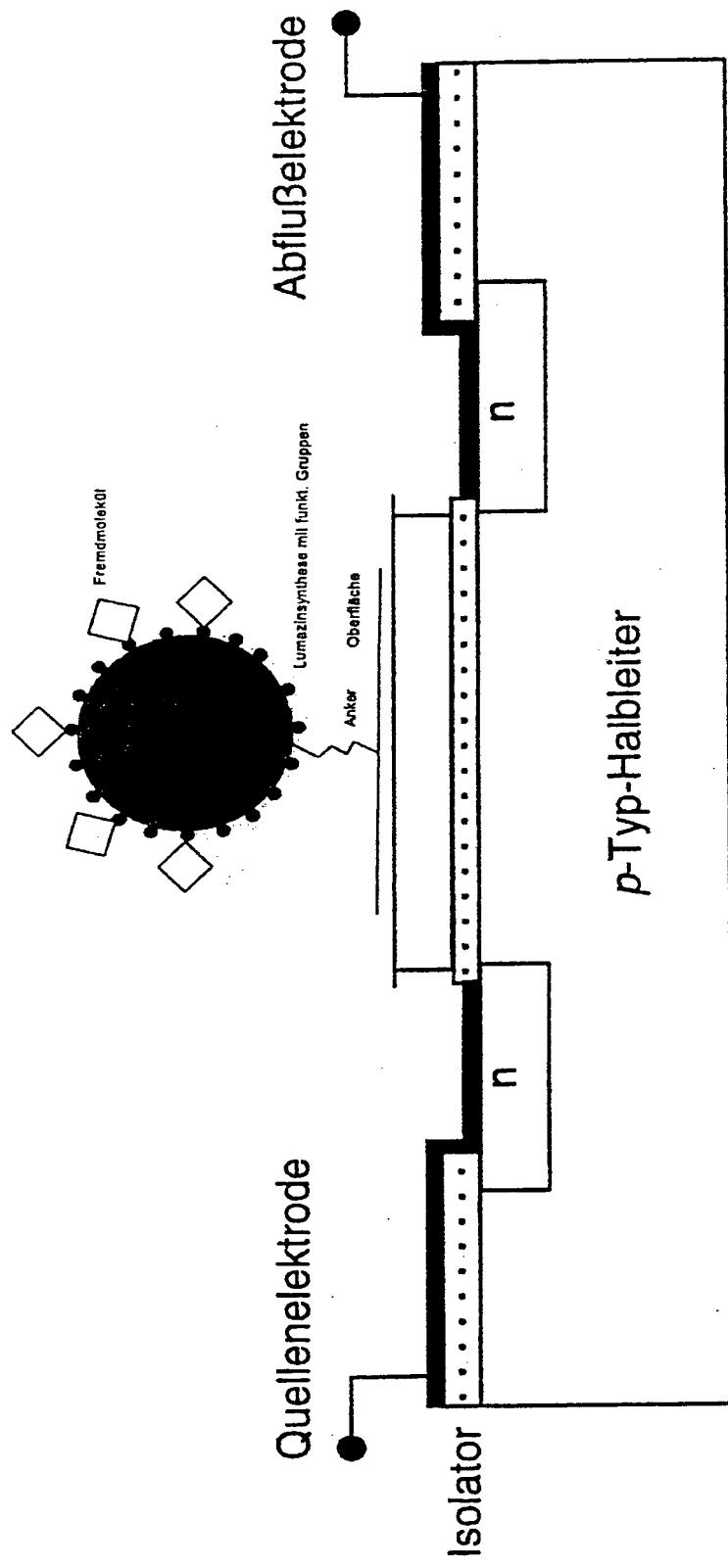


Figure 7

Seite 1

1	15 16	30 31	45 46	60 61	75 76	90
1 <i>M. avium</i>	-----	-----	-----	-----	-MSPRAAGVP EMEALDASG-VRLGI	22
2 <i>M. tuberculosis</i>	-----	-----	-----	-----	------MP DLPSLDASG-VRLAI	16
3 <i>C. ammoniagenes</i>	-----	-----	-----	-----	-MS-KEGLLP EVATIDATG-IVAV	21
4 <i>C. tepidum</i>	-----	-----	-----	-----	-MQVQNTI EGSLN-ASG-LKFAL	19
5 <i>A. aeolicus</i>	-----	-----	-----	-----	-MQIY EGKLT AEG-LRFGI	17
6 <i>T. maritima</i>	-----	-----	-----	-----	-MKVV QGDYR-GEG-LKIAV	17
7 <i>B. subtilis</i>	-----	-----	-----	-----	-MNII QGNLV-GTG-LKIGI	17
8 <i>B. amyloliquefaciens</i>	-----	-----	-----	-----	-MNII QGNLV-GTG-LKIGI	17
9 <i>A. pleuro pneumoniae</i>	-----	-----	-----	-----	-MAKI TGNLV-ATG-LKFGI	17
10 <i>S. pneumoniae</i>	-----	-----	-----	-----	-MNTY EGNLV-ANN-IKIGI	17
11 <i>S. aureus</i>	-----	-----	-----	-----	-MN-F EGKLI-GKD-LKVAI	16
12 <i>V. cholerae</i>	-----	-----	-----	-----	-MKVI EGGFP-APN-AKIAI	17
13 <i>P. phosphoreum</i>	-----	-----	-----	-----	-MKVI EGAIY-APN-AKVAI	17
14 <i>S. putrefaciens</i>	-----	-----	-----	-----	-MNIV QGNIE-AKN-ARVAI	17
15 <i>P. leiognathii</i>	-----	-----	-----	-----	-MKLL KG-VD-CTS-CIAI	16
16 <i>S. flexneri</i>	-----	-----	-----	-----	-MNII EANVA-TPD-ARVAI	17
17 <i>E. coli</i>	-----	-----	-----	-----	-MNII EANVA-TPD-ARVAI	17
18 <i>H. influenzae</i>	-----	-----	-----	-----	-MKVL EGSAV-APN-BKAV	17
19 <i>D. multivorans</i>	-----	-----	-----	-----	-MNIV EGKLS-LNGDKVAI	18
20 <i>H. pylori</i>	-----	-----	-----	-----	-MQII EGKLQ-LQGNRAVAI	18
21 <i>D. radiodurans</i>	-----	-----	-----	-----	------MORI EATLL--AHDLKFAI	17
22 <i>Synechocystis</i> -sp.	-----	-----	-----	-----	------MTVY EGSTTPPARPFPFAL	19
23 <i>P. gingivalis</i>	-----	-----	-----	-----	------MATAYHNLSDD YESVPCGKD-LRIGI	26
24 <i>A. thaliana</i>	MKSLASPPCRLIPT	AHROLNRSQSSACY	IHGGSSVNKSNNLSF	SSSTSGFASPLAYER	ELRSSFVQTAAVRHV	TGSLIRGEG-LRFAI
25 <i>M. jannaschii</i>	-----	-----	-----	-----	-----MVLVNLGE	9
26 <i>A. fulgidus</i>	-----	-----	-----	-----	-----MEKVKLGM	8
27 <i>M. thermoautotrophicum</i>	-----	-----	-----	-----	-----MKKVRIGA	8
28 <i>C. trachomatis</i>	-----	-----	-----	-----	-MKPL KGCPV-LKD-VRVAI	17
29 <i>S. cerevisiae</i>	-----	-----	-----	-----	-MAVKGLG KEDQVYDGSKIRVGI	22
30 <i>B. abortus</i>	-----	-----	-----	-----	MNQSCPNTSFKIAF	15

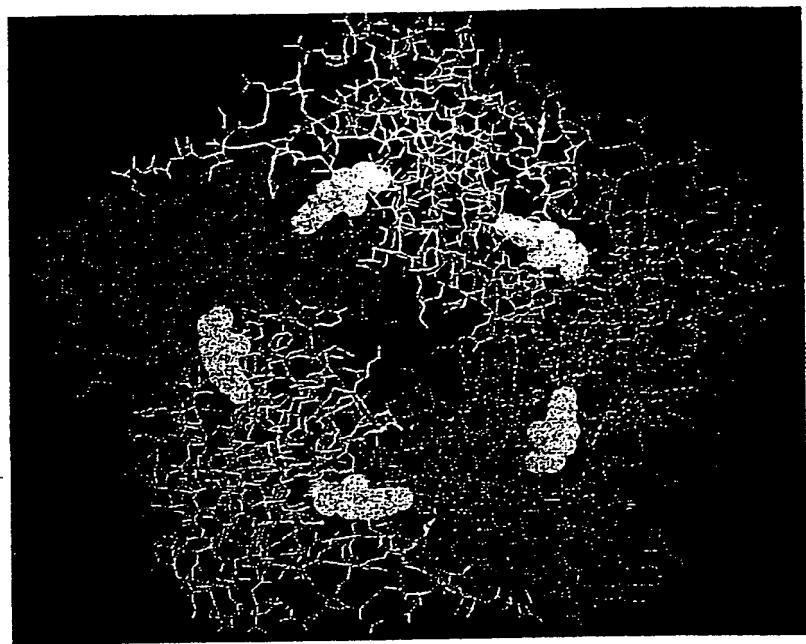
Seite 2

91	105 106	120 121	135 136	150 151	165 166	180
1 M. avium	VASTWHSRICDALLA GARKVAADSGVENPT V-----	VRVLGAE IPVVAQELAR -----	--NHDAAVVALGVVIR GOTPHFELYVCDAVTQ	99		
2 M. tuberculosis	VASSWIGKICDALLD GARKVAAGCGLDDPT V-----	VRVLGAE IPVVAQELAR -----	--NHDAAVVALGVVIR GOTPHFELYVCDAVTQ	93		
3 C. ammoniagenes	ISATWNAIDICDRH E RALHQQLGAEADG V-----	FRVVGAE IPVVAOEEAR -----	--HYDAVVALGVVIR GGTGHFDYVCDSVTQ	97		
4 C. tepidum	VVSRRFNDPFGQKIVE GAIIDCIVRKHG-GSAD V-----	EITVIRCPGAE LPSVTRKMLS -----	--GKYDAIVTGLVIR GSTPHFDEVIAEATK	100		
5 A. aeolicus	VASRFNHALVDRIVE GAIIDCIVRKHG-GREY V-----	DITLVRPGSWE IPVAGELARK -----	--EDIDAVIAIGVLIR GATPHFIDYIASEVSK	98		
6 T. maritima	VVPRENDFLVTSKLL GALDGKJRKHG-VSDE V-----	NITVVRPGSME AITYLKLRLDL -----	--GVHDAIIIVLGVAVIR GETYHENVVANEIGK	98		
7 B. subtilis	VVGRFNDETISKLLS GAEDALLJRKHG-VDTN V-----	DIDVAWWPAGAE IPFAAKKMAET -----	--KKYDAIIITLGTIVR GATTHDYVCNEAAK	98		
8 B. amyloliquifaciens	VVGRFNEFITSKLLS GAEDTLIRKHG-VESEN V-----	DIDVAWWPAGAE IPFAAKKMAET -----	--KKYDAVITLGTIVR GATTHDYVCNEAAK	98		
9 A. pleuro pneumoniae	VTARFNDFINDKLLS GAITLIVRKHG-AYEN V-----	DIDTAWVPAGAE IPLVAKKMAN -----	--GKYDAVICLGLTIVR GSTTHDYVCNEAAK	98		
10 S. pneumoniae	VVARFNEFITSKLLS GALDNLKNREN-VNEK V-----	DIEVAWVPAGAE IPLJASKMAKS -----	--KRYDAIIICLGLAVIR GNTSHDYVCSEVSK	98		
11 S. aureus	VVSRFNDEFTGRHHD-VNED V-----	NIDVAFVPGAE IPLVAKKLAAS -----	--GNYDAVITLGCIVR GATSHDYVCNEAAK	97		
12 V. cholerae	VISRFNSFINESSLIS GAITLTKRKGQISDD V-----	NITVVRCPGAE LPLVAQRVAKT -----	--GDYDAIVSLGCIVR GGTPHFEDYVCSEMNIK	99		
13 P. phosphoreum	VIAFENSFINESSLIS GALDTLKRKGQSYD V-----	DRYDAIIALGASVIR GGT-HFEYVASECNK	--DRYDAIIALGASVIR GGT-HFEYVASECNK	98		
14 S. putrefaciens	VISRFNSFINESSLIS GALDTLKRKGQSYD V-----	GKFDGIIIAILGAVIR GGTPIEDEVAGECNK	--GKFDGIIIAILGAVIR GGTPIEDEVAGECNK	99		
15 P. leioognathi	VIAFENSFINESSLIS GAINALQRKGQVKA V-----	GNTDIIIAIGAVIR GGTPIEDEVAGECNK	--GNTDIIIAIGAVIR GGTPIEDEVAGECNK	98		
16 S. flexneri	TIAFENNFINDSSLLE GAI DALKRGQVKE V-----	GKYDAVIALGTVR GGTAAFEYVAGGASN	--GKYDAVIALGTVR GGTAAFEYVAGGASN	99		
17 E. coli	TIAFENNFINDSSLLE GAI DALKRGQVKE V-----	GKYDAVIALGTVR GGTAAFEYVAGGASN	--GKYDAVIALGTVR GGTAAFEYVAGGASN	99		
18 H. influenzae	VIARENNSFINESSLLE GAI DALKRGQVKE V-----	KKFDGIIIAILGTVR GGTAAFEYVAGGASN	--KKFDGIIIAILGTVR GGTAAFEYVAGGASN	99		
19 D. multivorans	INARENHIIITDRIVE GARDAYLRHG-GKDE V-----	SKYDAVCCUCLGAVIR GGTPIHDFVYVSEATK	--SKYDAVCCUCLGAVIR GGTPIHDFVYVSEATK	99		
20 H. pylori	LTSRENHIIITDRLOE GAMDCFKRHG-GDED V-----	EKYDGVCVCLGAIIR GGTPIHDFVYVSEATK	--EKYDGVCVCLGAIIR GGTPIHDFVYVSEATK	99		
21 D. radiodurans	VSTRNHHLLIVDRIVE GAEFLVQHGGKTN V-----	LPLAAQALAKT -----	--GKYDAVIALGTVR GGTAAFEYVAGGASN	99		
22 Synechocystis sp.	VIARENNSFINESSLLE GAI DALKRGQVKE V-----	LPLAAQALAKT -----	--GKYDAVIALGTVR GGTAAFEYVAGGASN	99		
23 P. gingivalis	AVAEWNHNITEPLMK GAI DTLEHG-VSAD V-----	LPLAAQALAKT -----	--KKFDGIIIAILGTVR GGTAAFEYVAGGASN	99		
24 A. thaliana	VVARFNEVYTKLLE GAI ETKKS-VREE V-----	LPLAAQALAKT -----	--KKFDGIIIAILGTVR GGTAAFEYVAGGASN	99		
25 M. jannaschii	VIAEENRDITYMEK VAEFHAEFLGATVKY V-----	LDHFLVPGSYE VPLVARRLAET -----	--GKYDAVIALGTVR GGTAAFEYVAGGASN	99		
26 A. fulgidus	VVAEENRDITYMEI LGKEHAEFLGAEVS E-----	LDHFLVPGSYE VPLVARRLAET -----	--GKYDAVIALGTVR GGTAAFEYVAGGASN	99		
27 M. thermoautotroph.	VVAEENFDITAHMNL LAKEHARELDAITR V-----	LDHFLVPGSYE VPLVARRLAET -----	--GKYDAVIALGTVR GGTAAFEYVAGGASN	99		
28 C. trachomatis	VGSCFNSPIADRLVA GAQETFFDFGDPSS V-----	LDHFLVPGSYE VPLVARRLAET -----	--GKYDAVIALGTVR GGTAAFEYVAGGASN	99		
29 S. cerevisiae	IHARWNRVITDALKV GAIERMVSLG-VEEK V-----	LDHFLVPGSYE VPLVARRLAET -----	--GKYDAVIALGTVR GGTAAFEYVAGGASN	99		
30 B. abortus	IQARWHADIVDEARK SEVAELAAKTGGSE V-----	LDHFLVPGSYE VPLVARRLAET -----	--GKYDAVIALGTVR GGTAAFEYVAGGASN	99		

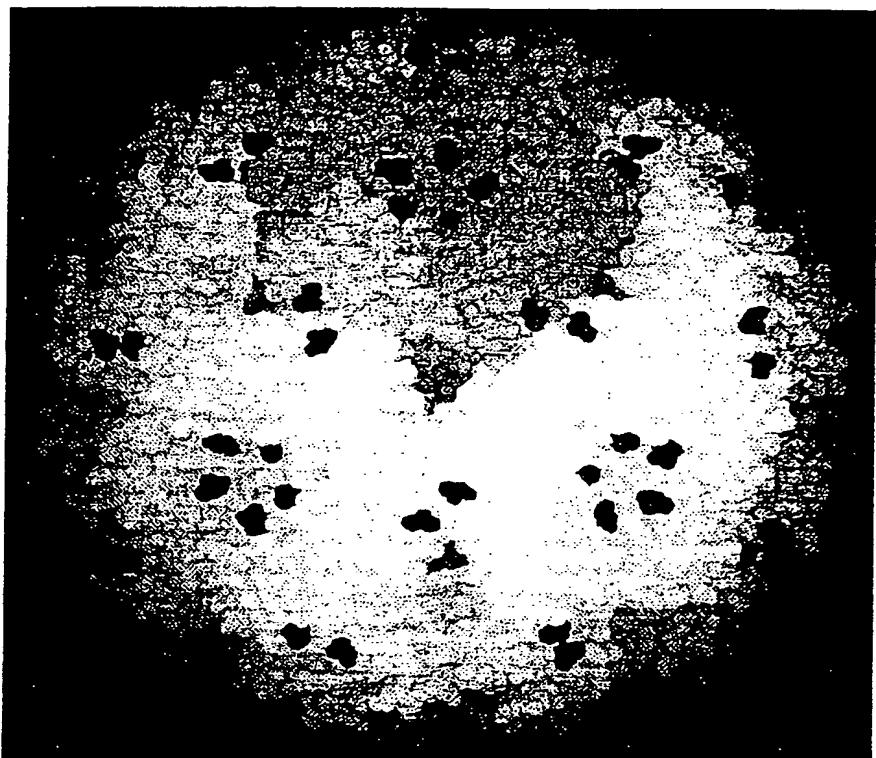
Seite 3

1. <i>M. avium</i>	181	195	196	210	211	225	226	240	241	255	256
2. <i>M. tuberculosis</i>		GITRVSILDASTP ^{AN}	GVLTTDNEQQALDRA	GLPDSA--	EDKGQAQ	AGAALSAAALTIRELR	ARS-----			160	
3. <i>C. ammoniagenes</i>		GLTRVSLDSSTP ^{AN}	GVLTTNTTEEQALDRA	GLPTSA--	EDKGQAQ	TVAALATAATLIRELR	AHS-----			154	
4. <i>C. tepidum</i>		GLTRIALDTSKP ^{AN}	GVLTVNTHDQAVDRS	GAPGAA--	EDKGQA	MOAALDTVQLQRNIK	ERASKRGL--			163	
5. <i>A. aeolicus</i>		GIAQVGMEAIPVSF	GVLTTENLEQATERA	GTKAG--	--NKGFD	ALAATENANLYQL--				155	
6. <i>T. maritima</i>		GLANLSLELRKPITF	GVTADTLEQATERA	GTKHG--	--NKGWEA	ALSAIEMANLFKSLR	--			154	
7. <i>B. subtilis</i>		AVAQFNMTSDIPIVF	GVLTTDTLEQALNRA	GAKSG--	--NKGFEA	AMVAIEMANLRKRLR	RDVFEDSNSGR			165	
8. <i>B. amyloliquefaciens</i>		GIAQQAANTTGVPVIF	GIVTTENIEQATERA	GTKAG--	--NKGVD	AVSAIEMANLNRSE	--			154	
9. <i>A. pleuro pneumoniae</i>		GIGAVALAETGVPVIF	GVLTTENIEQATERA	GTKAG--	--NKGSEC	ALGAIEIIVNLVKA--	--			153	
10. <i>S. pneumoniae</i>		GIAQISLNSEIPVMF	GVLTTDTIEQATERA	GTKAG--	--NKGSEC	AQGAIEVNNLIRTLD	A-----			155	
11. <i>S. aureus</i>		GVSKVNDQTNVPVIF	GILTTESIEQATERA	GTKAG--	--NKGFEA	AVSAIEMANLNSK	A-----			154	
12. <i>V. cholerae</i>		GLAQVSLEFSIPVAF	GVLTVDTIDQATERA	GTKAG--	--NKGFEA	ALSAIEMINVLSEID	S-----			156	
13. <i>P. phosphoreum</i>		GLAOVALDYNIPVAF	GVLTVDTLEQATERA	GTKAG--	--NKGAE	ALMLLEMVNNLIAQE	S-----			155	
14. <i>S. putrefaciens</i>		GLAQIALEFDLIPVAF	GVLTTDTIEQALERS	GTKAG--	--NKGAE	ALSLLEWNVNLQQLE	QQL-----			158	
15. <i>P. leiochrothi</i>		GLAQALEYQTIPVAF	GVLTVDSIEQATERA	GTKMG--	--NKGEEA	ALSAI-----	---			144	
16. <i>S. flexneri</i>		GLAHVAQDSEIPVAF	GVLTTESIEQATERA	GTKAG--	--NKGAE	ALTALEMINVLKAIA	K-----			156	
17. <i>E. coli</i>		GLAHVAQDSEIPVAF	GVLTTESIEQATERA	GTKAG--	--NKGAE	ALTALEMINVLKAIA	K-----			156	
18. <i>H. influenzae</i>		GLGKVAMDAEIPVAF	GVLTTENIEQATERA	GTKAG--	--NKGAE	ALTALEMVNNLQQID	AA-----			157	
19. <i>D. multivorans</i>		GVANVALQFAKPVAF	GVLTVDSIEQATERA	GSKAG--	--NKGFEA	MVTVIELLSLYSALK	N-----			156	
20. <i>H. pylori</i>		GLAHAMLKYSMPVSF	GVLTTDNIEQATERA	GSKAG--	--NKGFEA	MSTLIELLLSICQTLK	G-----			156	
21. <i>D. radiodurans</i>		GLINTSLHTGVPVAF	GVLTTDTVEQALNRA	GIKAG--	--NKGAE	VLAMIEANTNLKQIE	R-----			155	
22. <i>Synechocystis-sp.</i>		GIAAISQTGVPVIF	GILTTDTM00ALERA	GIKS-----	--NKGWGY	AMNALEMASINRMA	PLTEG-----			164	
23. <i>P. gingivalis</i>		GITONINIDGEFVPVIF	GVLTTETMLOAEERA	GGKHG--	--NKGTEA	AVTALKMAGLERI--				161	
24. <i>A. thaliana</i>		GVLSASINSGVPCIF	GVLTCEDMDQALNRS	GGKAG--	--NKGRET	ALTALEMASFEHHL	K-----			227	
25. <i>M. jannaschii</i>		KIADALQYDKPVTL	GISGPG--MTRLQAE	RVDYG--	--KRAVEA	AVKMVKRLKALEE--				141	
26. <i>A. fulgidus</i>		KIMDLSLEYGKPVTL	GISGPG--MGRIAATE	RVDYA--	--KRAVEA	AVKLVKRKRKEYDAEG	S-----			143	
27. <i>M. thermoautotroph.</i>		KIADALDYDKPVAL	GISGPG--MTRLEAHQ	RVDYA--	--KRAVEA	AVKMYRRRLKEDI--				139	
28. <i>C. trachomatis</i>		GVSRLSLDFCLPITF	SVITAPMEAAWERA	GIRKP--	--NLGASG	MKTALEMASLFLSLIG	KE-----			157	
29. <i>S. cerevisiae</i>		ALMNLOQEKVDMPPVIF	GLITCMTTEEQALARA	GIDEAHSMHNHGEDW	GAAVEMAYKFGKNA	F-----				169	
30. <i>B. abortus</i>		GMMQVQLETEVPVLS	VVLTPHFFHESKEHH	DFFFAH--FKVKGVEA	AHAAQIVVERSRIA	ALV-----				158	

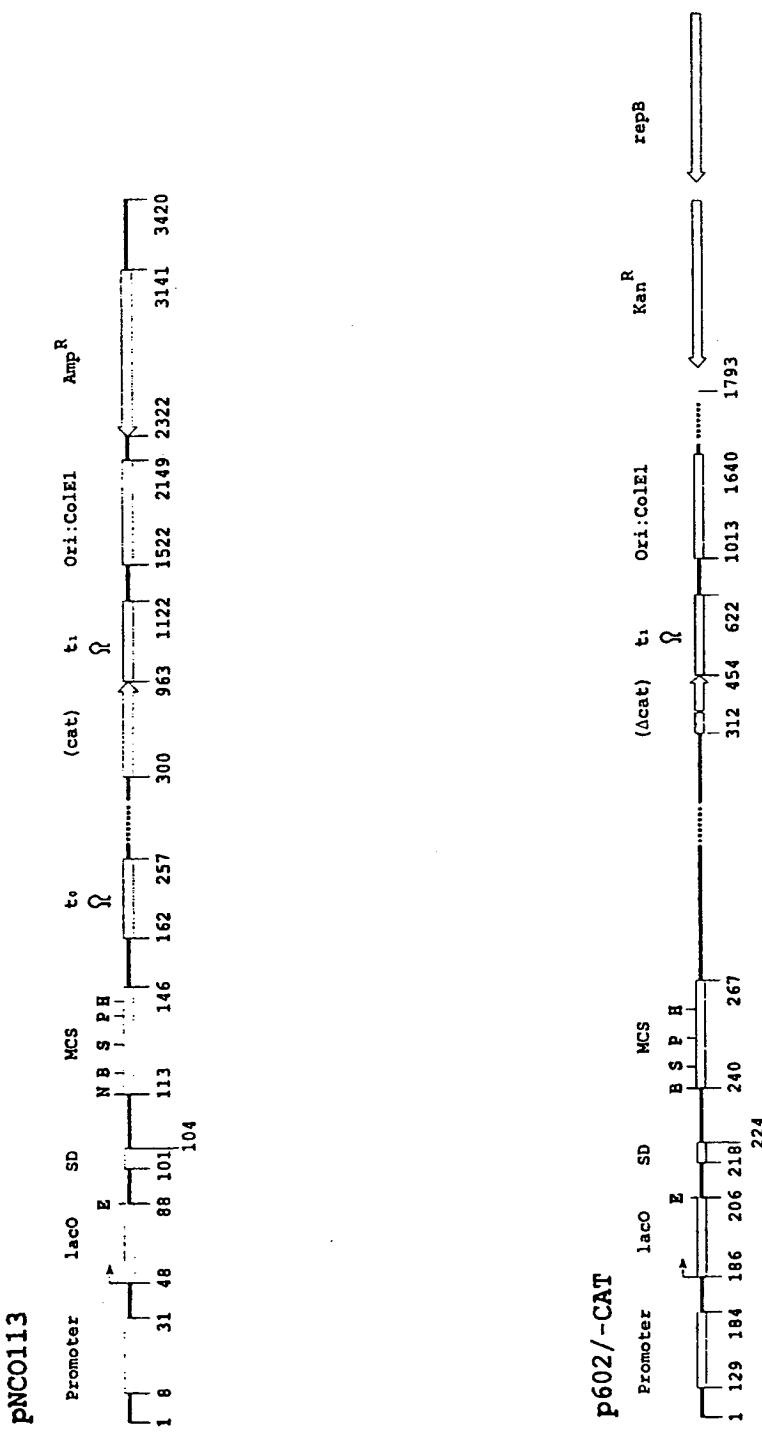
Figu 8



Figur 9



Figur 10



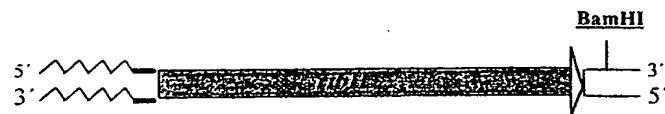
Figur 11

1. PCR (dNTP's; Oligonukleotide PNCO-M1/C93S und PNCO-M2/RibH-3; *PNCO-BS-Lusy* (Matrizen-DNA für die PCR); Taq-Polymerase)

PNCO-M1/C93S [Fragment-A]

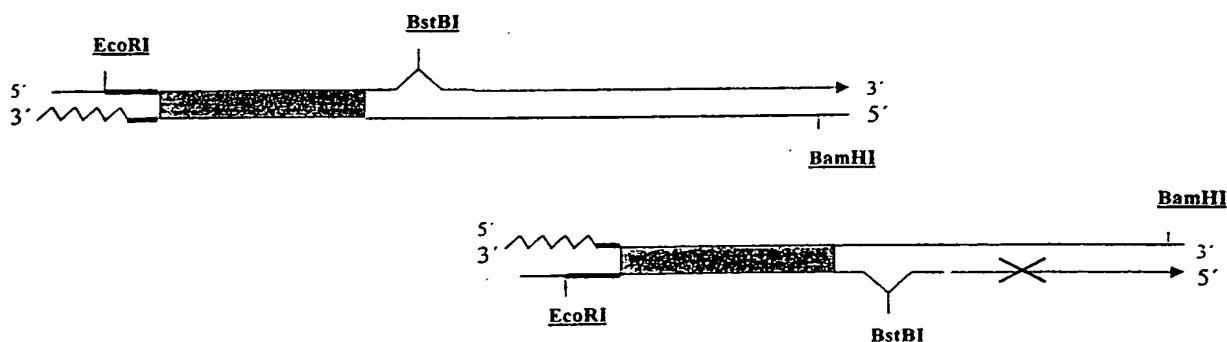


PNCO-M2/RibH-3 [Fragment-B]



Figur 12

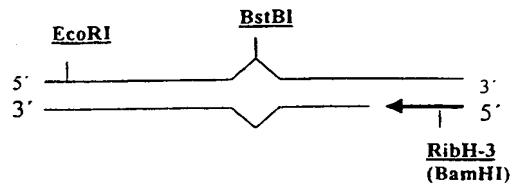
2. PCR (dNTP's; Fragment A und Fragment B der 1. PCR; Taq-Polymerase)



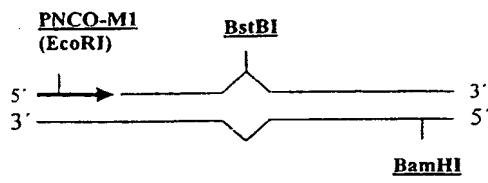
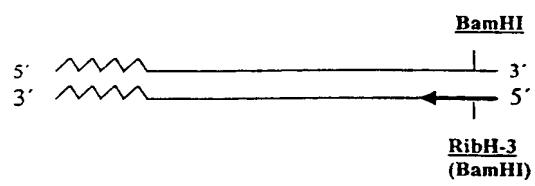
Figur 13

3. PCR (dNTP's; Produkt der 2. PCR; Oligonukleotide PNCO-M1/RibH-3; Taq-Polymerase)

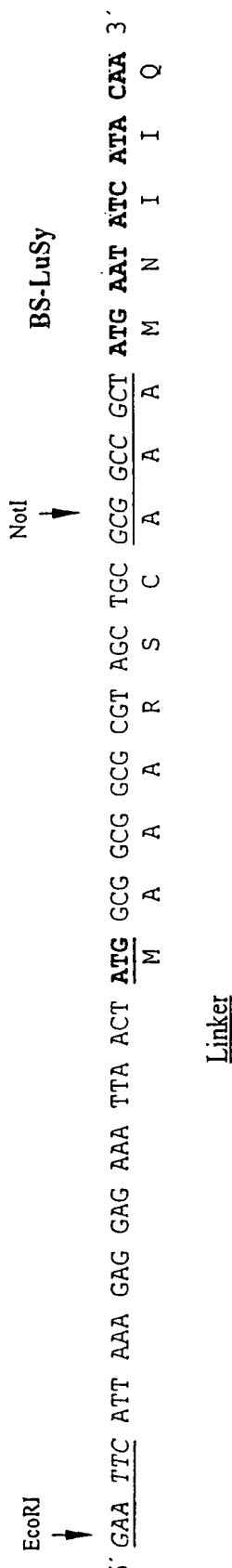
exponentielle Amplifikation



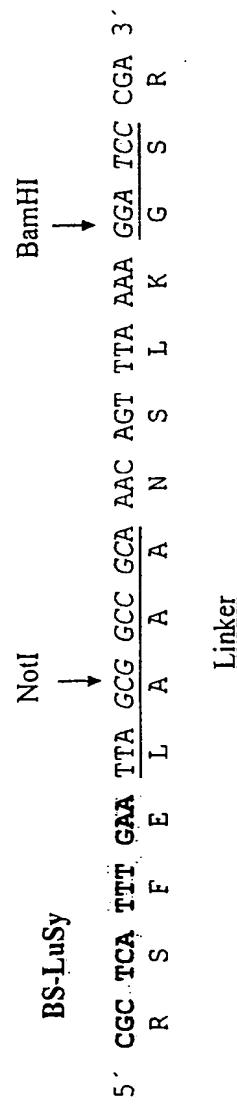
lineare Amplifikation



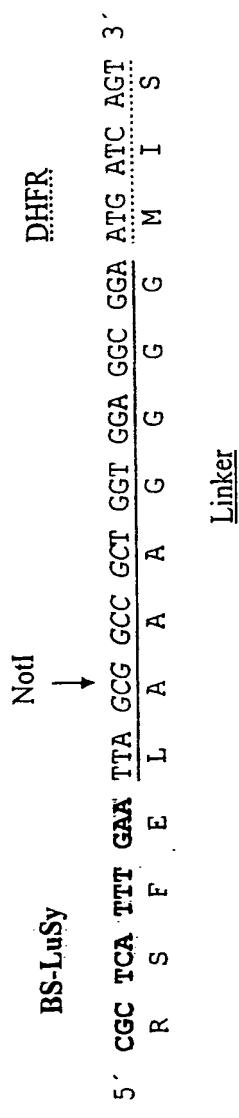
Figur 14



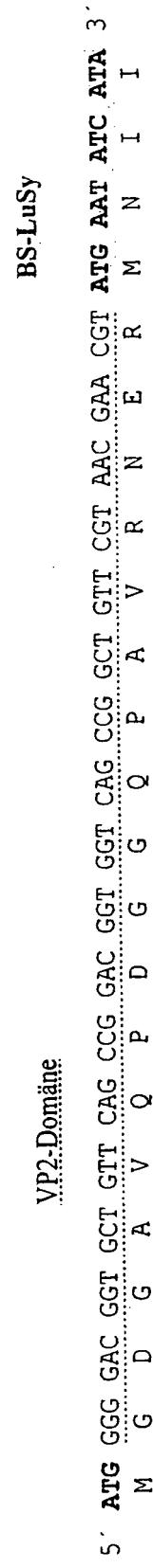
Figur 15



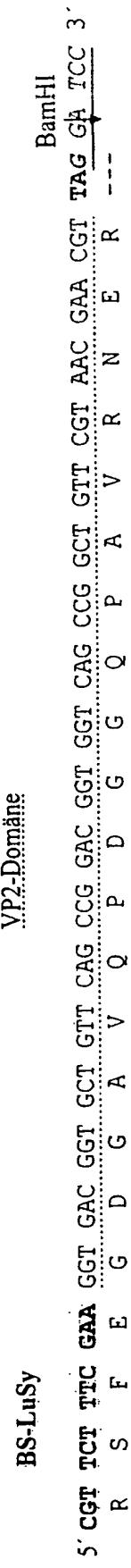
Figur 16



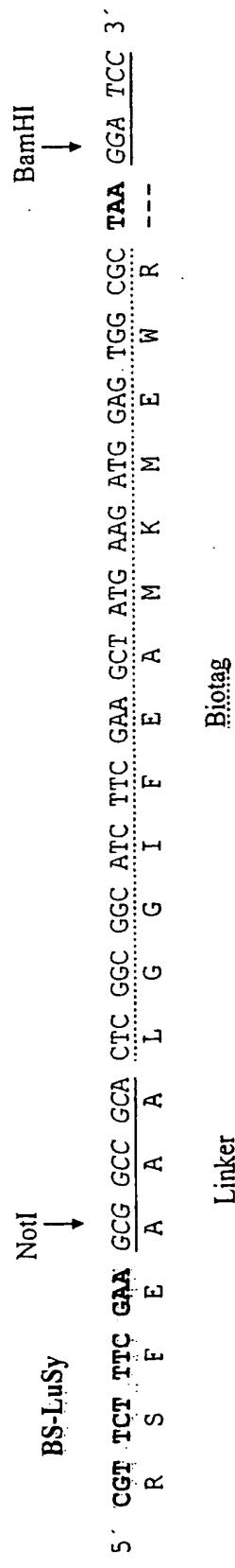
Figur 17



Figur 18



Figur 19



Figur 20

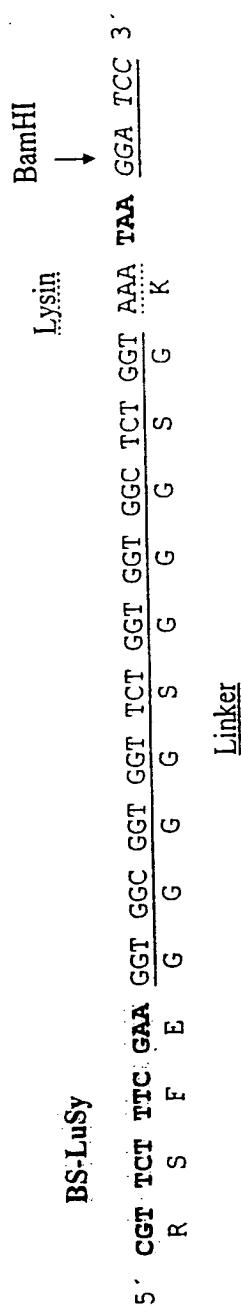


Figure 21

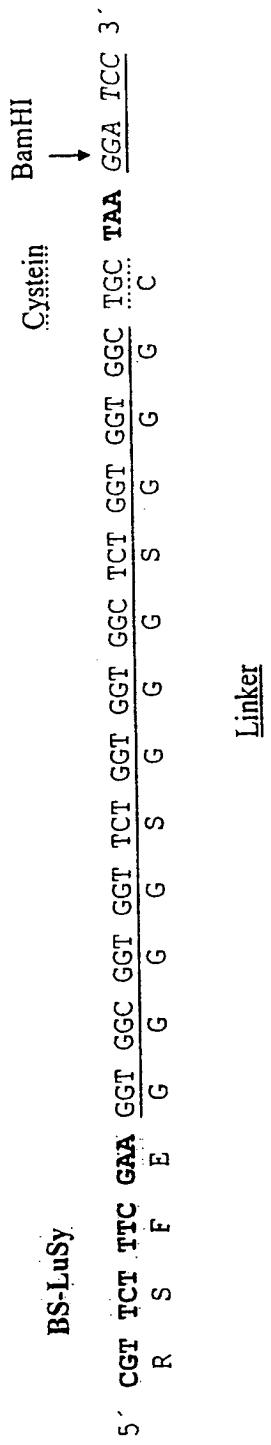
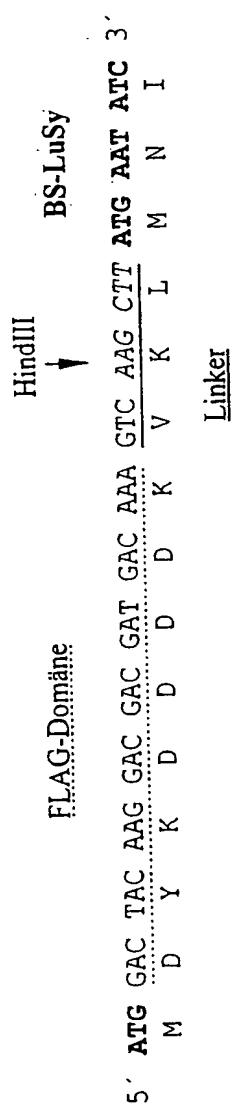
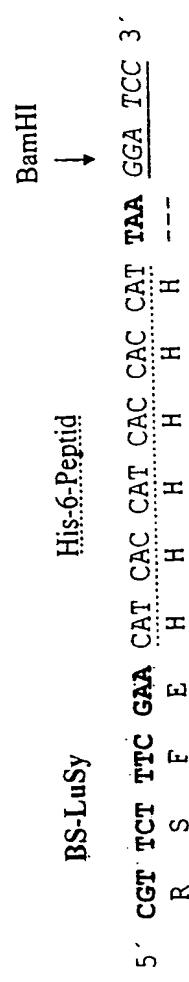


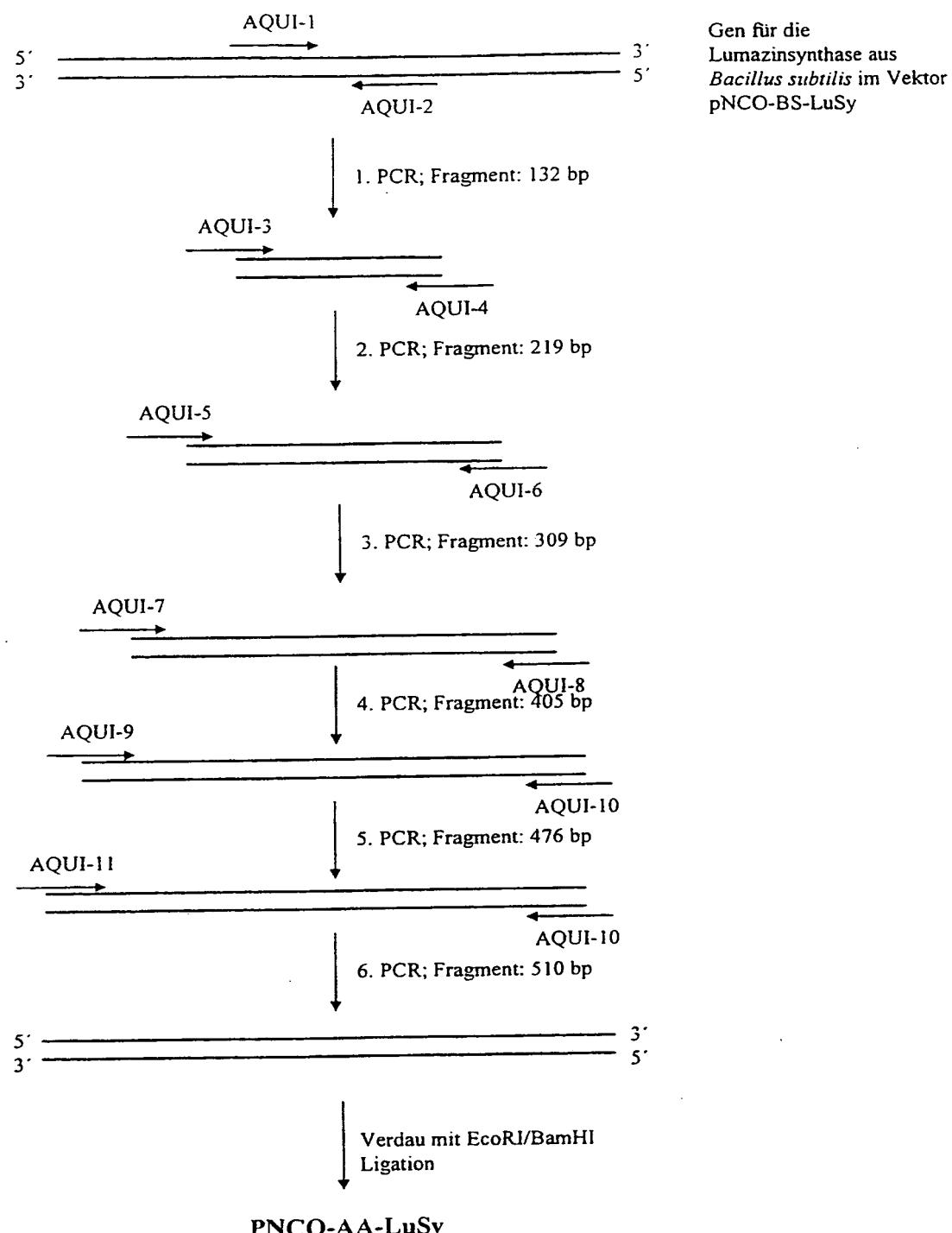
Figure 22

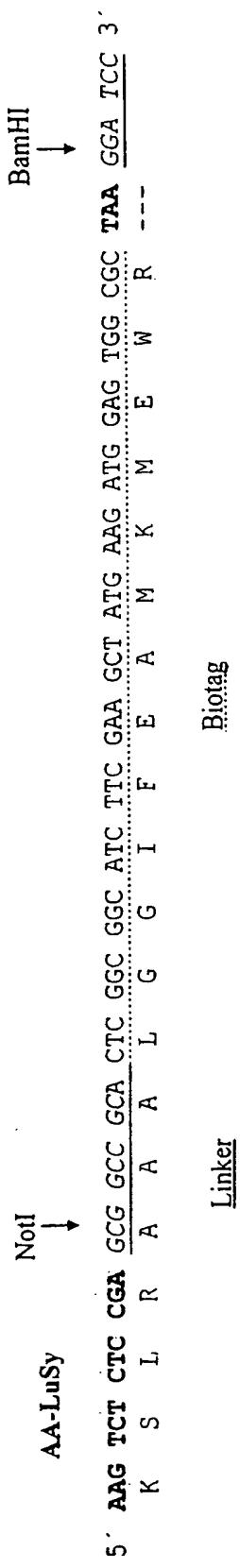


Figur 23

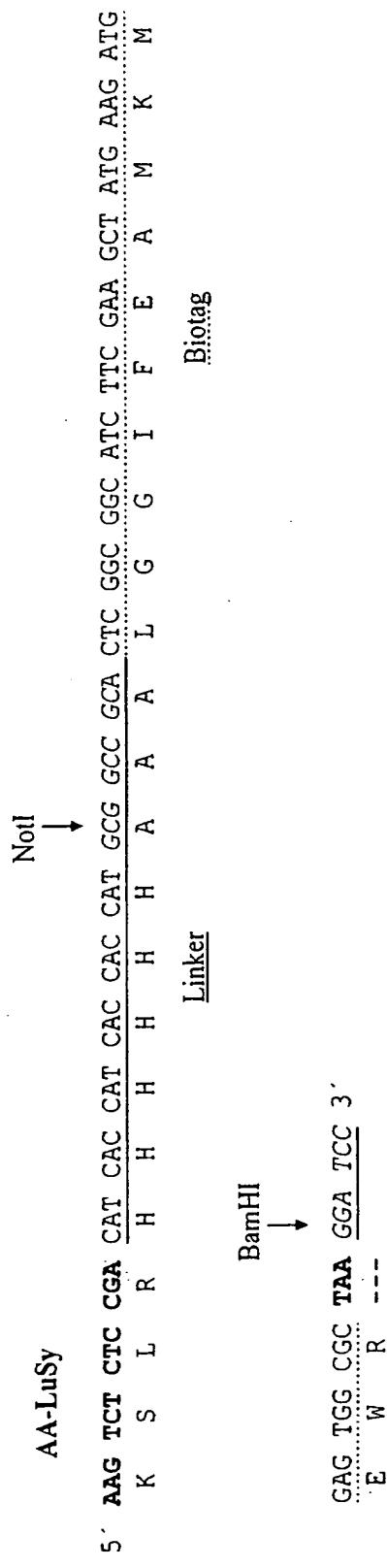


Figur 24

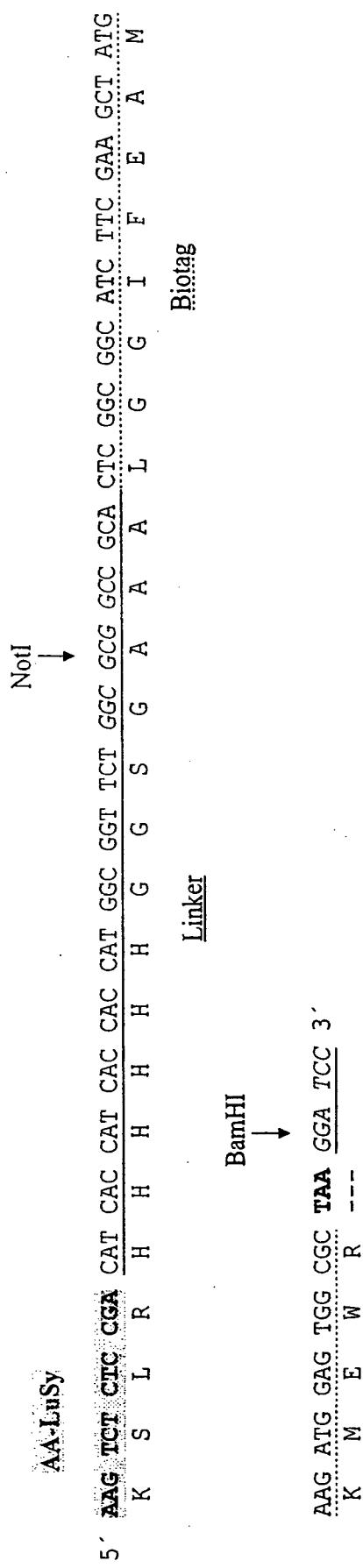
**Figur 25**



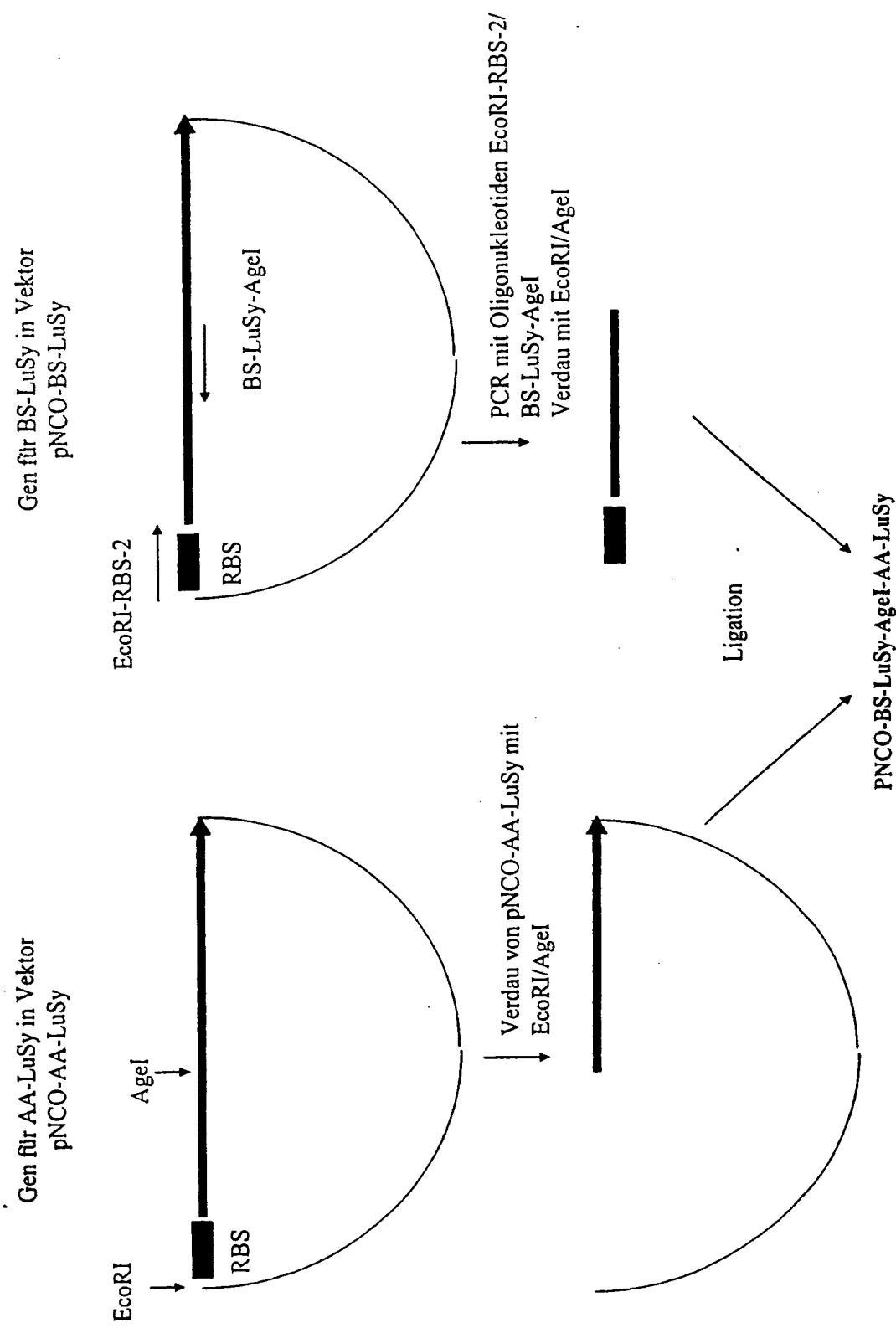
Figur 26



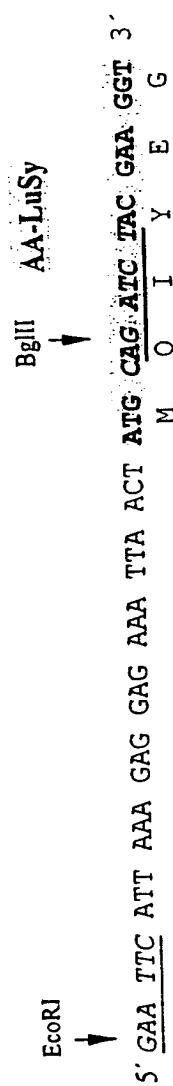
Figur 27



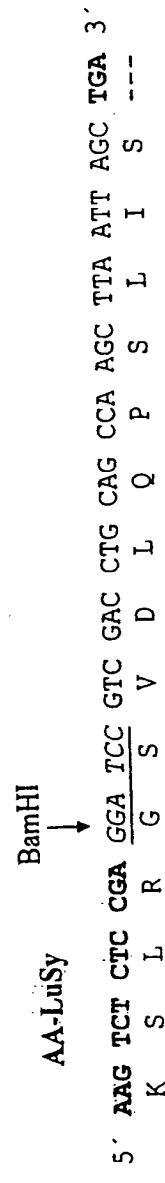
Figur 28



Figur 29



Figur 30



Figur 31

Sequenzprotokolle

SEQ ID No.1: pNCO113

Expressionsvektor zur Überexpression von Genen in E. coli

SEQUENCE 3420 BP; 388 A; 316 C; 828 G; 888 T; 0 OTHER..

CTCGAGAAAT CATAAAAAT TTATTCGTT TGTGAGCGGA TACAATTAT AATAGATTCA
ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAG AGGAGAAATT AACCATGGGA
GGATCCGTCG ACCTGCAGCC AAGCTTATT AGCTGAGCTT GGACTCCTGT TGATAGATCC
AGTAATGACC TCAGAACTCC ATCTGGATT GTTCAGAACG CTCGGTTGCC GCCGGCGTT
TTTTATTGGT GAGAATCCAA GCTAGCTGG CGAGATTTTC AGGAGCTAAG GAAGCTAAAA
TGGAGAAAAA AATCACTGGA TATACCACCG TTGATATATC CCAATGGCAT CGTAAAGAAC
ATTTTGGGC ATTTCACTCA GTTGCTCAAT GTACCTATAA CCAGACCGTT CAGCTGGATA
TTACGGCCTT TTTAAAGACC GTAAAGAAAA ATAAGCACAA GTTTTATCCG GCCTTTATTC
ACATTCTTGC CCGCCTGATG AATGCTCATC CGGAATTCG TATGGCAATG AAAGACGGTG
AGCTGGTGAT ATGGGATAGT GTTCACCCCTT GTTACACCGT TTTCCATGAG CAAACTGAAA
CGTTTCATC GCTCTGGAGT GAATACCACG ACGATTCCG GCAGTTCTA CACATATATT
CGCAAGATGT GGCCTGTTAC GGTGAAAACC TGGCCTATTT CCCTAAAGGG TTTATTGAGA
ATATGTTTT CGTCTCAGCC AATCCCTGGG TGAGTTTCAC CAGTTTGAT TTAAACGTGG
CCAATATGGA CAACTTCTTC GCCCCCCTT TCACCATGCA TGGGCAAATA TTATACGAA
GGCGACAAGG TGCTGATGCC GCTGGCGATT CAGGTTCATC ATGCCGTCTG TGATGGCTTC
CATGTCGGCA GAATGCTTAA TGAATTACAA CAGTACTGCG ATGAGTGGCA GGGCGGGCG
TAATTTTTT AAGGCAGTTA TTGGTGCCT TAAACGCCTG GGGTAATGAC TCTCTAGCTT
GAGGCATCAA ATAAAACGAA AGGCTCAGTC GAAAGACTGG GCCTTCGTT TTATCTGTTG
TTTGTGGTG AACGCTCTCC TGAGTAGGAC AAATCCGCCG CTCTAGAGCT GCCTCGCGCG
TTTCGGTGAT GACGGTAAA ACCTCTGACA CATGCAGCTC CCGGAGACGG TCACAGCTTG
TCTGTAAGCG GATGCCGGGA GCAGACAGC CCGTCAGGGC GCGTCAGCGG GTGTTGGCGG
GTGTCGGGGC GCAGCCATGA CCCAGTCACG TAGCGATAGC GGAGTGTATA CTGGCTTAAC
TATGCGGCAT CAGAGCAGAT TGTACTGAGA GTGCACCATA TGGGTGTGA AATACCGCAC
AGATGCGTAA GGAGAAAATA CCGCATCAGG CGCTCTCCG CTCCCTCGCT CACTGACTCG
CTGCGCTCGG TCTGTGGCT GCGCGAGCG GTATCAGCTC ACTCAAAGGC GGTAATACGG
TTATCCACAG AATCAGGGGA TAACCGAGGA AAGAACATGT GAGCAAAAGG CCAGCAAAAG
GCCAGGAACC GTAAAAAGGC CGCGTTGCTG GCGTTTTCC ATAGGCTCCG CCCCCCTGAC
GAGCATCACA AAAATGACG CTCAAGTCAG AGGTGGCGAA ACCCGACAGG ACTATAAAAGA
TACCAAGGCCTT TTCCCCCTGG AAGCTCCCTC GTGCGCTCTC CTGTTCCGAC CCTGCCGCTT
ACCGGATACC TGTCCGCCTT TCTCCCTCG GGAAGCGTGG CGCTTCTCA ATGCTCACGC
TGTAGGTATC TCAGTTGGT GTAGGTCGTT CGCTCCAAGC TGGGCTGTGT GCACGAACCC
CCCGTTCAAGC CCGACCGCTG CGCCTTATCC GGTAACTATC GTCTTGAGTC CAACCCGGTA
AGACACGACT TATGCCACT GGCAGCAGCC ACTGGTAACA GGATTAGCAG AGCGAGGTAT
GTAGGCGGTG CTACAGAGTT CTTGAAGTGG TGGCCTAACT ACGGCTACAC TAGAAGGACA
GTATTTGGTA TCTGCGCTCT GCTGAAGCCA GTTACCTTCG GAAAAAGAGT TGGTAGCTCT
TGATCCGGCA AACAAACCAC CGCTGGTAGC GGTGGTTTT TTGTTGCAC GCAGCAGATT

ACGCGCAGAA AAAAAGGATC TCAAGAAGAT CCTTTGATCT TTTCTACGGG GTCTGACGCT
 CAGTGGAACG AAAACTCACG TTAAGGGATT TTGGTCATGA GATTATCAA AAGGATCTTC
 ACCTAGATCC TTTTAAATTA AAAATGAAGT TTTAAATCAA TCTAAAGTAT ATATGAGTAA
 ACTTGGTCTG ACAGTTACCA ATGCTTAATC AGTGAGGCAC CTATCTCAGC GATCTGTCTA
 TTTCGTTCAT CCATAGCTGC CTGACTCCCC GTCGTGTAGA TAACTACGGAT ACGGGAGGGC
 TTACCATCTG GCCCCAGTGC TGCAATGATA CCGCGAGACC CACGCTCACC GGCTCCAGAT
 TTATCAGCAA TAAACCAGCC AGCCGGAAGG GCCGAGCGCA GAAGTGGTCC TGCAACTTTA
 TCCGCCTCCA TCCAGTCTAT TAATTGTTGC CGGGAAAGCTA GAGTAAGTAG TTCGCCAGTT
 AATAGTTGC GCAACGTTGT TGCCATTGCT ACAGGGCATCG TGGTGTCAACG CTCGTCGTTT
 GGTATGGCTT CATTCAAGCTC CGGTTCCCAA CGATCAAGGC GAGTTACATG ATCCCCCATG
 TTGTGCAAAA AAGCGGTTAG CTCCTTCGGT CCTCCGATCG TTGTCAGAAG TAAGTTGGCC
 GCAGTGTAT CACTCATGGT TATGGCAGCA CTGCATAATT CTCTTACTGT CATGCCATCC
 GTAAGATGCT TTTCTGTGAC TGGTGAGTAC TCAACCAAGT CATTCTGAGA ATAGTGTATG
 CGGCGACCGA GTTGCCTTG CCCGGCGTCA ATACGGGATA ATACCGGCC ACATAGCAGA
 ACTTTAAAAG TGCTCATCAT TGGAAACGT TCTTCGGGGC GAAAACCTCTC AAGGATCTTA
 CCGCTGTTGA GATCCAGTTC GATGTAACCC ACTCGTGCAC CCAACTGATC TTCAGCATCT
 TTTACTTTCA CCAGCGTTTC TGGGTGAGCA AAAACAGGAA GGCAAAATGC CGCAAAAAAG
 GGAATAAGGG CGACACGGAA ATGTTGAATA CTCATACTCT TCCTTTTCA ATATTATTGA
 AGCATTATAC AGGGTTATTG TCTCATGAGC GGATACATAT TTGAATGTAT TTAGAAAAAT
 AAACAAATAG GGGTCCGCG CACATTCCC CGAAAAGTGC CACCTGACGT CTAAGAAACC
 ATTATTATCA TGACATTAAC CTATAAAAAT AGGCGTATCA CGAGGCCCTT TCGTCTTCAC

//

SEQ ID No. 2: p602/-CAT

Expressionsvektor zur Überexpression von Genen in E. coli und B. subtilis

SEQUENCE: 5302 BP; 1502 A; 1208 C; 962 G; 1630 T; 0 OTHER..

GAATTAATTC CTCGAGGCTG GCATCCCTAA CATATCCGAA TGGTTACTTA AACAAACGGAG
 GACTAGCGTA TCCCTTCGCA TAGGGTTGA GTTAGATAAAA GTATATGCTG AACTTTCTTC
 TTTGCTCAA GAATCATAAAA AAATTTATTT GCTTTCAGGA AAATTTTCT GTATAATAGA
 TTCAAATTGT GAGCGGATAA CAATTGAAAT TCATTAAGA GGAGAAATTA ACTATGAGGG
 GATCCGTCGA CCTGCAGCCA AGCTTAGCTA GCTAGAGCTT GGCGAGATTT TCAGGAGCTA
 AGGAAGCTAA AATGGAGAAA AAAATCACTG GATATACCAAC CGTTGATATA TCCCAATGGC
 ATCGTAAAGA ACATTTGAG GCATTTCACTG CAGTTGCTCA ATGTACCTAT AACCAAGACCG
 TTCAGACTGC GATGAGTGGC AGGGCGGGGC GAAATTTTT TAAGGCAGTT ATTGGTGCCTC
 TTAAACGCCT GGGGTAATGA CTCTCTAGCT TGAGGCATCA AATAAAACGA AAGGCTCAGT
 CGAAAGACTG GGCCTTCGTT TTTATCTGTT GTTTGTCGGT GAACGCTCTC CTGAGTAGGA
 CAAATCCGCC CCTCTAGAGC TGCCCTGCCGC GTTTGGTGA TGACGGTGAA AACCTCTGAC
 ACATGCAGCT CCCGGAGACG GTCACAGCTT GTCTGTAAGC GGATGCCGGG AGCAGACAAG

CCCGTCAGGG CCCGTCAGCG GGTGTTGGCG GGTGTCGGGG CGCAGCCATG ACCCAGTCAC
GTAGCGATAG CGGAGTGTAT ACTGGCTTAA CTATGCGGCA TCGAGCGAGA TTGTACTGAG
AGTGCACCAT ATGCGGTGTG AAATACCGCA CAGATGCGTA AGGAGAATAT ACCGCATCAG
GCGCTCTTCC GCTTCCTCGC TCACTGACTC GCTGCGCTCG GTCGTTGGC TGCGCGAGC
GGTATCAGCT CACTCAAAGG CGGTAAATACG GTTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGCAGG
AAAGAACATG TGAGCAGGAAAG GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC CGTAAAAAGG CGCGGTTGCT
GGCGTTTTC CATAGGCTCC GCCCCCTGA CGAGCATTAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA
GAGGTGGCGA AACCCGACAG GACTATTAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG GAAGCTCCCT
CGTGCCTCT CCTGTTCCGA CCCTGCCGCT TACCGATAAC CTGTCGCGCT TTCTCCCTTC
GGGAAGCGTG GCGCTTTCTC AATGCTCACG CTGTTAGGTAT CTCAGTTCGG TGTAGGTCGT
TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG TGCACGAAAC CCCCAGTCAG CCCGACCGCT GCGCCTTATC
CGGTAACAT CGTCTTGAGT CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATGCCAC TGGCAGCAGC
CACTGGTAAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT TCTTGAAGTG
GTGGCCTAAC TACGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTGGT ATCTGCGCTC TGCTGAAGCC
AGTTACCTTC GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC TTGATCCGGC AAACAAACCA CCGCTGGTAG
CGGTGGTTT TTTGTTGCA AGCAGCAGAT TACGCGCAGA AAAAAAGGAT CTCAAGAAGA
TCCTTGATC TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGAAC GAAAATCAC GTTAAGGGAT
TTTGGTCATG AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTCGGTA CCGCTGATTT
CACTTTTGC ATTCTACAAA CTGCATAACT CATATGTAAA TCGCTCCTT TTAGGTGGCA
CAAATGTGAG GCATTTTCGC TCTTCGGC AACCACTTCC AAGTAAAGTA TAACACACTA
TACTTTATAT TCATAAAAGTG TGTGCTCTGC GAGGCCTCCA GTGCCGACCA AAACCATAAA
ACCTTTAAGA CCTTTCTTT TTTTACGAGA AAAAAAGAAC AAAAAAAACCT GCCCTCTGCC
ACCTCAGCAA AGGGGGGTTT TGCTCTCGT CTCGTTAAA AATCAGCAAG GGACAGGTAG
TATTTTTGA GAAGATCACT CAAAAAATCT CCACCTTAA ACCCTTGCCA ATTTTATTT
TGTCCGTTT GTCTAGCTTA CCGAAAGCCA GACTCAGCAA GAATAAAATT TTTATTGTCT
TTCGGTTTC TAGTGTAAACG GACAAAACCA CTGAAATAA AAAAGATACA AGAGAGGTCT
CTCGTATCTT TTATTCAAGCA ATCGCGCCCG ATTGCTGAAC AGATTAATAA TAGATTTAG
CTTTTATTT GTGAAAAAAA GCTAATCAA TTGTTGTCGG GATCAATTAC TGCAAAGTCT
CGTTCATCCC ACCACTGATC TTTAATGAT GTATTGGGT GCAAAATGCC CAAAGGCTTA
ATATGTGAT ATAATTCACT AATTCCCTCT ACTTCAATGC GGCAACTAGC AGTACCAAGCA
ATAAACGACT CCGCACCTGT ACAAAACGGT GAATCATTAC TACCGAGAGCG CCAGCTTCAT
CACTTGCCCTC CCATAGATGA ATCCGAAACCT CATTACACAT TAGAACTGCG AATCCATCTT
CATGGTGAAC CAAAGTGAAC CCTAGTTAT CGCAATAAAA ACCTATACTC TTTTTAATAT
CCCCGACTGG CAATGCGGGG TAGACTGTAA CATTCTCACG CATAAAATCC CCTTTCATTT
TCTAATGTAA ATCTATTACC TTATTATTAA TTCAATTGCG TCATAATTAA TCCCTTTCT
TATTACGCAA AATGGCCCGA TTAAAGCACA CCCTTTATTG CGTTAATGCG CCATGACAGC
CATGATAATT ACTAATACTA GGAGAAGTTA ATAAATACGT AACCAACATG ATTAACAATT
ATTAGAGGTC ATCGTTCAAA ATGGTATGCG TTTTGACACA TCCACTATAT ATCCGTGTCG
TTCTGTCCAC TCCTGAATCC CATTCCAGAA ATTCTCTAGC GATTCAGAA GTTTCTCAGA
GTCGGAAAGT TGACCGAGACA TTACGAACGT GCACAGATGG TCATAACCTG AAGGAAGATC
TGATTGCTTA ACTGCTTCAG TTAAGACCGA AGCGCTCGTC GTATAACAGA TGCGATGATG
CAGACCAATC AACATGGCAC CTGCCATTGC TACCTGTACA GTCAAGGATG GTAGAAATGT

TGTCGGTCCT TGCACACGAA TATTACGCCA TTTGCCTGCA TATTCAACAA GCTCTTCTAC
GATAAGGGCA CAAATCGCAT CGTGGAACGT TTGGGCTTCT ACCGATTTAG CAGTTGGATA
CACTTTCTCT AAGTATCCAC CTGAATCATA AATCGGAAA ATAGAGAAAA ATTGACCATG
TGTAAGCGGC CAATCTGATT CCACCTGAGA TGCATAATCT AGTAAATCT CTTCGCTATC
AAAATTCACT TCCACCTTCC ACTCACCGGT TGTCATTCA TGGCTGAACT CTGCTTCCTC
TGTTGACATG ACACACATCA TCTCAATATC CGAATAGGGC CCATCAGTCT GACGACCAAG
AGAGCCATAA ACACCAATAG CCTTAACATC ATCCCCATAT TTATCCAATA TTCGTTCCCTT
AATTCATGA ACAATCTTCA TTCTTTCTTC TCTAGTCATT ATTATTGGTC CATTCACTAT
TCTCATTCCC TTTTCAGATA ATTTAGATT TGCTTTCTA AATAAGAATA TTTGGAGAGC
ACCGTTCTTA TTCAAGCTATT AATAACTCGT CTTCTTAAGC ATCCTTCAAT CCTTTAATA
ACAATTATAG CATCTAATCT TCAACAAACT GGCCCCTTG TTGAACACT TTAAATAAAA
ATAATTTTC CGTTCCCAAT TCCACATTGC AATAATAGAA AATCCATCTT CATCGGCTTT
TTCGTATCA TCTGTATGAA TCAAATGCC TTCTTCTGTG TCATCAAGGT TTAATTTTT
ATGTATTTCT TTTAACAAAC CACCATAGGA GATTAACCTT TTACGGTGT AACCCTTCCTC
CAAATCAGAC AAACGTTCA AATTCTTTTC TTCAATCATCG GTCATAAAAT CCGTATCCTT
TACAGGATAT TTTGCAGTT CGTCATTGC CGATTGTATA TCCGATTTAT ATTTATTTT
CGGTGAAATC ATTTGAACCTT TTACATTTGG ATCATAGTCT AATTCATTG CCTTTTCCA
AAATTGAATC CATTGTTTT GATTCACGTA GTTTCTGTA TTCTTAAAT AAGTTGGTTC
CACACATACC ATACATGCA TGTGCTGATT ATAAGAATT TCTTTATTAT TTATTGTCAC
TTCCGTTGCA CGCATAAAAC CAACAAAGATT TTTATTAATT TTTTATATT GCATCATTG
GCGAAATCCT TGAGCCATAT CTGACAAACT CTTATTAAT TCTTCGCCAT CATAAACATT
TTTAACGTGTT ATGTGAGAA ACAACCAACG AACTGTTGGC TTTGTTAA TAACTTCAGC
AACAAACCTT TGTGACTGAA TGCCATGTTT CATTGCTCTC CTCCAGTTGC ACATTGGACA
AAGCCTGGAT TTACAAAACC ACACCTGATA CAACTTTCTT TCGCCTGTTT CACGATTTG
TTTATACTCT ATATTTTCAG CACAACTTT TACTCTTCA GCCTTTAA ATTCAAGAAT
ATGCAGAAGT TCAAAGTAAT CAACATTAGC GATTTCTTT TCTCTCCATG GTCTCACTTT
TCCACTTTT GTCTTGTCCA CTAAACCCCT TGATTTTCA TCTGAATAA TGCTACTATT
AGGACACATA ATATTAAGAA AAACCCCCAT CTATTTAGTT ATTTGTTAG TCACCTATAA
CTTTAACAGA TGGGGTTTT CTGTGCAACC AATTTAAGG GTTTCAATA CTTTAAACAA
CATACATACC AACACCTCAA CGCACCTTC AGCAACTAAA ATAAAAATGA CGTTATTTCT
ATATGTATCA AGATAAGAAA GAACAGTTC AAAACCATCA AAAAAAGACA CCTTTTCAGG
TGCTTTTTT ATTTTATAAA CTCATCCCT GATCTCGACT TCGTTCTTT TTTACCTCTC
GGTTATGAGT TAGTTCAAAT TCGTTCTTT TAGGTTCTAA ATCGTGTGTT TCTTGGAAATT
GTGCTGTTT ATCCTTTACC TTGTCTACAA ACCCCTAAA AACGTTTTA AAGGCTTTA
AGCCGTCTGT ACGTTCCCTA AG//

SEQ ID No. 3: pNCO-BS-Lusy

Lumazinsynthase-Gen aus *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli* exprimiert

SEQUENCE 3885 BP; 1040 A; 905 C; 939 G; 1001 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAT CATAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACCATGAAT
 ATCATACAAG GAAATTAGT TGGTACAGGT CTTAAAATCG GAATCGTAGT AGGAAGATTT
 AATGATTTA TTACGAGCAA GCTGCTGAGC GGAGCAGAAG ATGCGCTGCT CAGACATGGC
 GTAGACACAA ATGACATTGA TGTGGCTTGG GTTCCAGGCG CATTGAAAT ACCGTTGCT
 GCGAAAAAAA TGGCGGAAAC AAAAAAATAT GATGCTATTA TCACATTGGG CACTGTCATC
 AGAGGCGCAA CGACACATTA CGATTATGTC TGCAATGAAG CTGCAAAAGG CATCGCGCAA
 GCAGCAAACA CTACTGGTGT ACCTGTCATC TTTGGAATTG TAACAACGTAA AAACATCGAA
 CAGGCTATCG AGCGTGCAGG CACAAAAGCG GGCAACAAAG GTGTAGATTG TGCTGTTCT
 GCCATTGAAA TGGCAAACCTT AAACCGTTCT TTGCAATAAC CATGGGGATC CGTCGACCTG
 CAGCCAAGCT TAATTAGCTG AGCTTGGACT CCTGTTGATA GATCCAGTAA TGACCTCAGA
 ACTCCATCTG GATTTGTTCA GAACGCTCGG TTGCCGCCGG GCGTTTTTA TTGGTGAGAA
 TCCAAGCTAG CTTGGCGAGA TTTTCAGGAG CTAAGGAAGC TAAAATGGAG AAAAAAATCA
 CTGGATATAC CACCGTTGAT ATATCCCATT GGCATCGTAA AGAACATTG GAGGCATTTC
 AGTCAGTTGC TCAATGTACC TATAACCAGA CCGTTCAGCT GGATATTACG GCCTTTTAA
 AGACCGTAAA GAAAATAAG CACAAGTTT ATCCGGCCTT TATTCACATT CTTGCCGCC
 TGATGAATGC TCATCCGGAA TTTCGTATGG CAATGAAAGA CGGTGAGCTG GTGATATGGG
 ATAGTGTCA CCCTTGTAC ACCGTTTCC ATGAGCAAAC TGAAACGTT TCATCGCTCT
 GGAGTGAATA CCACGACGAT TTCCGGCAGT TTCTACACAT ATATCGCAA GATGTGGCGT
 GTTACGGTGA AAACCTGGCC TATTTCCCTA AAGGGTTTAT TGAGAATATG TTTTCGTCT
 CAGCCAATCC CTGGGTGAGT TTCACCAGTT TTGATTTAAA CGTGGCCAAT ATGGACAAC
 TCTTCGCCCT CGTTTCACC ATGCATGGC AAATATTATA CGCAAGGCAGA CAAGGTGCTG
 ATGCCGCTGG CGATTCAAGGT TCATCATGCC GTCTGTGATG GCTTCCATGT CGGCAGAATG
 CTTAATGAAT TACAACAGTA CTGCGATGAG TGGCAGGGCG GGGCGTAATT TTTTAAGGC
 AGTTATTGGT GCCCTTAAAC GCCTGGGTA ATGACTCTCT AGCTTGAGGC ATCAAATAAA
 ACGAAAGGCT CAGTCGAAAG ACTGGGCCTT TCGTTTTATC TGTTGTTGT CGGTGAACGC
 TCTCCTGAGT AGGACAAATC CGCCGCTCTA GAGCTGCCCT CGCGCTTTCG GTGATGACGG
 TGAAAACCTC TGACACATGC AGCTCCCGA GACGGTCACA GCTTGTCTGT AAGCGGATGC
 CGGGAGCAGA CAAGCCCGTC AGGGGCCGTC AGCGGGTGTGTT GGGGGGTGTC GGGGCCAGC
 CATGACCCAG TCACGTAGCG ATAGCGGAGT GTATACTGGC TTAACTATGC GGCATCAGAG
 CAGATTGTAC TGAGAGTGCA CCATATGCCG TGTGAAATAC CGCACAGATG CGTAAGGAGA
 AAATACCGCA TCAGGCGCTC TTCCGCTTCC TCGCTCACTG ACTCGCTGCG CTCGGTCTGT
 CGGCTGCCGC GAGCGGTATC AGCTCACTCA AAGGCGGTAA TACGGTTATC CACAGAATCA
 GGGGATAACG CAGGAAAGAA CATGTGAGCA AAAGGCCAGC AAAAGGCCAG GAACCGTAAA
 AAGGCCGCST TGCTGGCGTT TTTCCATAGG CTCCGCCCTT CTGACGAGCA TCACAAAAAT
 CGACGCTCAA GTCAGAGGTG GCGAAACCCG ACAGGACTAT AAAGATACCA GGCCTTCCC
 CCTGGAAAGCT CCCTCGTGCG CTCTCCTGTT CCGACCCCTGC CGCTTACCGG ATACCTGTCC
 GCCTTCTCC CTTGGGAAG CGTGGCGCTT TCTCAATGCT CACGCTGTAG GTATCTCAGT
 TCGGGTGTAGG TCGTTCGCTC CAAGCTGGC TGTGTGCACG AACCCCCCGT TCAGCCCGAC

CGCTGCGCCT TATCCGGTAA CTATCGTCTT GAGTCCPACC CGGTAAGACA CGACTTATCG
 CCACTGGCAG CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGAGCGA GGTATGTAGG CGGTGCTACA
 GAGTTCTTGA AGTGGTGGCC TAACTACGGC TACACTAGAA GGACAGTATT TGGTATCTGC
 GCTCTGCTGA AGCCAGTTAC CTTCGGAAAA AGAGTTGGTA GCTCTTGATC CGGCAAACAA
 ACCACCGCTG GTAGCGGTGG TTTTTTGTG TCGAAGCAGC AGATTACCGG CAGAAAAAAA
 GGATCTCAAG AAGATCCTT GATCTTTCT ACGGGGTCTG ACGCTCAGTG GAACGAAAAC
 TCACGTTAAG GGATTTGGT CATGAGATTA TCAAAAGGA TCTTCACCTA GATCCTTTA
 AATTAAAAAT GAAGTTTAA ATCAATCTAA AGTATATATG AGTAAACCTG GTCTGACAGT
 TACCAATGCT TAATCAGTGA GGCACCTATC TCAGCGATCT GTCTATTCG TTCATCCATA
 GCTGCCTGAC TCCCCGTCGT GTAGATAACT ACGATACGGG AGGGCTTACC ATCTGGCCCC
 AGTGCTGCAA TGATACCGCG AGACCCACGC TCACCGGCTC CAGATTTATC AGCAATAAAC
 CAGCCAGCCG GAAGGGCCGA GCGCAGAAGT GGTCCTGCAA CTTTATCCGC CTCCATCCAG
 TCTATTAATT GTTGCCTGGGA AGCTAGAGTA AGTAGTTCGC CAGTTAATAG TTTGCCAAC
 GTTGTGCA TTGCTACAGG CATCGTGGTG TCACGCTCGT CGTTGGTAT GGCTTCATTC
 AGCTCCGGTT CCCAACGATC AAGGCAGATT ACATGATCCC CCATGTTGTC CAAAAAAAGCG
 GTTAGCTCCT TCGGTCTCC GATCGTTGTC AGAAGTAAGT TGGCCGCAGT GTTATCACTC
 ATGGTTATGG CAGCACTGCA TAATTCTCTT ACTGTCATGC CATCCGTAAG ATGCTTTCT
 GTGACTGGTG AGTACTCAAC CAAGTCATTC TGAGAATAAGT GTATGCGGCC ACCGAGTTGC
 TCTTGCCCCG CGTCAATAACG GGATAATAAC GCGCCACATA GCAGAACTTT AAAAGTGCTC
 ATCATTGGAA AACGTTCTTC GGGCGAAAA CTCTCAAGGA TCTTACCGCT GTTGAGATCC
 AGTTCGATGT AACCCACTCG TGCAACCCAC TGATCTTCAG CATCTTTAC TTTCACCAGC
 GTTTCTGGGT GAGCAAAAC AGGAAGGCAA AATGCCGCAA AAAAGGGAAT AAGGGCGACA
 CGGAAATGTT GAATACTCAT ACTCTTCCTT TTTCAATATT ATTGAAGCAT TTATCAGGGT
 TATTGCTCTCA TGAGCGGATA CATATTTGAA TGTATTTAGA AAAATAAACAA AATAGGGGTT
 CCGCGCACAT TTCCCCGAAA AGTGCCACCT GACGTCTAAG AAACCATTAT TATCATGACA
 TTAACCTATA AAAATAGGCG TATCACGAGG CCCTTCGTC TTCAC//

SEQ ID No. 4: p602-BS-Lusy

Expressionsvektor p602/-CAT mit Lumazinsynthase-Gen aus *Bacillus subtilis*

SEQUENCE 5767 BP; 1654 A; 1297 C; 1073 G; 1743 T; 0 OTHER;

GAATTAATTC CTCGAGGCTG GCATCCCTAA CATATCCGAA TGGTTACTTA AACAAACGGAG
 GACTAGCGTA TCCCTTCGCA TAGGGTTTGA GTTATGATAAA GTATATGCTG AACCTTCTTC
 TTTGCTCAA GAATCATAAA AAATTTATTT GCTTTAGGA AAATTTTCT GTATAATAGA
 TTCAAATTGT GAGCGGATAAA CAATTGAAAT TCATTAAGA GGAGAAATTG ACTATGAATA
 TCATACAAGG AAATTTAGTT GGTACAGGTC TTAAATCGG AATCGTAGTA GGAAGATTAA
 ATGATTTAT TACGAGCAAG CTGCTGAGCG GAGCAGAAGA TGCCTGCTC AGACATGGCG
 TAGACACAAA TGACATTGAT GTGGCTTGGG TTCCAGGCC ATTGAAATA CGCTTGCTG
 CGAAAAAAAT GGCAGAAACA AAAAATATG ATGCTATTAT CACATTGGC ACTGTCATCA

GAGGCCAAC GACACATTAC GATTATGTCT GCAATGAGC TGC_{AAA}GGC ATCGCGCAAG
CAGCAAACAC TACTGGTGT_A CCTGTCA_TTCT TTGGATTGT AACAACTGAA AACATCGAAC
AGGCTATCGA CGCGGCCGGC ACAAAAGCGG GCAACAAAGG TGTAGATTGT GCTGTTCTG
CCATTGAAAT CGCAAAC_TTA AACCGTTCTT TCGAATTA_ACC ATGGGGATCC GTCGACCTGC
AGCCAAGCTT AGCTAGCTAG AGCTTGGGA GATTTTCAGG AGCTAAGGAA CCTAAAATGG
AGAAAAAAAT CACTGGATAT ACCACCGTTG ATATATCCCA ATGGCATCGT AAAGAACATT
TTGAGGCATT TCAGTCAGTT GCTCAATGTA CCTATAACCA GACCGTT_CAG ACTGCGATGA
GTGGCAGGGC GGGCGTAAT TTTTTAAGG CAGTTATTGG TGCCTTAAA CGCCTGGGT
AATGACTCTC TAGCTTGAGG CATCAAA_TAA AACGAAAGGC TCAGTCGAAA GACTGGGCCT
TTCGTTTAT CTGTTGTTG TCGGTGAACG CTCTCCTGAG TAGGACAAAT CCGCCGCTCT
AGAGCTGCCT GCCGCGTTTC GGTGATGACG GTGAAAACCT CTGACACATG CAGCTCCCGG
AGACGGTCAC AGCTTGCTG TAAGCGGATG CCGGGAGCAG ACAAGCCC_GT CAGGGCGCGT
CAGCGGGTGT TGGCGGGTGT CGGGCGCAG CCATGACCCA GTCACGTAGC GATAGCGGAG
TGTATACTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC ACCATATGCG
GTGTGAAATA CGC_ACAGAGT GCGTAAGGAG AAAATACCGC ATCAGGCGCT CTTCCGCTTC
CTCGCTCACT GACTCGCTGC GCTCGGT_CT TCGGCTGCCG CGAGCGGTAT CAGCTCACTC
AAAGGCGGT_A ATACGGTTAT CCACAGAATC AGGGATAAC GCAGGAAAGA ACATGTGAGC
AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA GGAACCGTAA AAAGGCCGCG TTGCTGGCGT TTTCCATAG
GCTCCGCC_C CCTGACGAGC ATCACAAAAA TCGACGCTCA AGTCAGAGGT GGC_AACCC
GACAGGACTA TAAAGATA_C AGGCGTTCC CCCTGGAAGC TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT
TCCGACCTG CCGCTTACCG GATACCTGTC CGCCTTCTC CCTC_GGGAA GCGTGGCGCT
TTCTCAATGC TCACGCTGTA GGTATCTCAG TTCGGTGTAG GTCGTTCGCT CCAAGCTGGG
CTGTGTGCAC GAACCCCCCG TTCAGCCGA CGC_GTGCC TTATCCGTA ACTATCGTCT
TGAGTCAAAC CCGGTAAGAC ACGACTTATC GCCACTGGCA GCAGCCACTG GTAACAGGAT
TAGCAGAGCG AGGTATGTAG GCGGTGCTAC AGAGTTCTG AAGTGGTGGC CTAAC_ACGG
CTACACTAGA AGGACAGTAT TTGGTATCTG CGCTCTGCTG AAGCCAGTTA CCTTCGGAAA
AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT CGGGCAAA_A AACCA_CCGCT GGTAGCGGTG GTTTTTTGT
TTGCAAGCAG CAGATTACGC GCAGAAAAAA AGGATCTAA GAAGATCCTT TGATCTTTC
TACGGGGTCT GACGCTCAGT GGAACGAAAA CTCACGTTAA GGGATTTGG TCATGAGATT
ATCAAAAAGG ATCTTCACCT AGATCCTTT CGGTACCGCT GATTCACTT TTTGCATTCT
ACAAACTGCA TAACTCATAT GTAAATCGCT CCTTTTTAGG TGGCACAAAT GTGAGGCATT
TTCGCTCTT CCGGCAACCA CTTCCAAGTA AAGTATAACA CACTATACTT TATATT_CATA
AAGTGTGT_G CCTGCGAGGC GTCCAGTG_C GACCAAAACC ATAAAACCTT TAAGACCTT
CTTTTTTTA CGAGAAAAAA GAAACAAAAA AACCTGCC_T CTGCCACCTC AGCAAAGGGG
GGTTTGCTC TCGTGTCTCGT TTAAP_AATCA GCAAGGGACA GGTAGTATT_T TTTGAGAAGA
TCAC_TCAAAA AATCTCCACC TTTAAACCT TGCCAA_TTTT TATTTGTCC GTTTGTCTA
GCTTACCGAA AGCCAGACTC AGCAAGAATA AAATTTTAT TGTCTTCGG TTTTCTAGTG
TAACGGACAA AACCAC_TCAAA AATAAAAAG ATACAGAGA GGTCTCTCGT ATCTTTTATT
CAGCAATCGC GCCCGATTGC TGAACAGATT AAT_AATAGAT TTTAGCTTT TATTTGTTGA
AAAAAGCTAA TCAAATTGTT GTCGGGATCA ATTACTGCAA AGTCTCGTTC ATCCCACCAC
TGATCTTTA ATGATGTATT GGGGTGCAA_A ATGCCAAAG GCTTAATATG TTGATATAAT
TCATCAATT_C CCTCTACTTC AATGCGGCAA CTAGCAGTAC CAGCAATAAA CGACTCCGCA

CCTGTACAAA CGGGTGAATC ATTACTCGA GAGCGCCAGC TTCACTCACTT GCCTCCCATA
 GATGAATCCG AACCTCATTA CACATTAGAA CTGCGAATCC ATCTTCATGG TGAACCAAAG
 TGAAACCTAG TTTATCGCAA TAAAAACCTA TACTCTTTT AATATCCCCG ACTGGCAATG
 CGGGATAGAC TGTAACATTC TCACCGATTA AATCCCCTT CATTCTCAA TGTAAATCTA
 TTACCTTATT ATTAATTCAA TTCGCTCAT AATTAATCCTT TTTCTTATTA CGCAAAATGG
 CCCGATTTAA GCACACCCCT TATTCGTTA ATGCGCCATG ACAGCCATGA TAATTACTAA
 TACTAGGAGA AGTTAATAAA TACGTAACCA ACATGATTAA CAATTATTAG AGGTCACTGT
 TCAAAATGGT ATGCGTTTG ACACATCCAC TATATATCCG TGTCGTTCTG TCCACTCCTG
 AATCCCATTG CAGAAATTCT CTAGCGATTG CAGAAGTTTC TCAGAGTCGG AAAGTTGACC
 AGACATTACG AACTGGCACA GATGGTCATA ACCTGAAGGA AGATCTGATT GCTTAACTGC
 TTCAGTTAAG ACCGAAGCGC TCGTCGTATA ACAGATGCGA TGATGCAGAC CAATCAACAT
 GGCACCTGCC ATTGCTACCT GTACAGTCAA GGATGGTAGA AATGTTGTCG GTCCTGCAC
 ACGAATATTA CGCCATTGTC CTGCATATTG AAACAGCTCT TCTACGATAA GGGCACAAAT
 CGCAGCTGG AACGTTGGG CTTCTACCGA TTTAGCAGTT GGATACACTT TCTCTAAGTA
 TCCACCTGAA TCATAAATCG GCAAAATAGA GAAAAATTGA CCATGTGTAA GCGGCCAATC
 TGATTCCACC TGAGATGCAT AATCTAGTAG AATCTCTCG CTATCAAAT TCACCTCCAC
 CTTCCACTCA CCGGTTGTCC ATTCACTGGCT GAACTCTGCT TCCTCTGTTG ACATGACACA
 CATCATCTCA ATATCCGAAT AGGGCCCACG AGTCTGACGA CCAAGAGAGC CATAAACACC
 AATAGCCTTA ACATCATCCC CATATTTATC CAATATTGTC TCCCTTAATT CATGAACAAT
 CTTCATTCTT TCTTCTCTAG TCATTATTAT TGGTCCATTG ACTATTCTCA TTCCCTTTTC
 AGATAATTAGT AGATTTGCTT TTCTAAATAA GAATATTGG AGAGCACCCT TCTTATTCA
 CTATTAATAA CTCGTCTCC TAAGCATTCTC TCAATCCTT TAATAACAAT TATAGCATCT
 AATCTTCAAC AAACTGGCCC GTTTGTTGAA CTACTCTTTA ATAAAATAAT TTTTCCGTT
 CCAATTCCAC ATTGCAATAA TAGAAAATCC ATCTTCATCG GCTTTTCTG CATCATCTGT
 ATGAATCAA TCGCCTCTT CTGTGTCACT AAGGTTAAT TTTTTATGTA TTTCTTTAA
 CAAACCACCA TAGGAGATTA ACCTTTACG GTGTAAACCT TCCTCCAAAT CAGACAAACG
 TTTCAAATTC TTTCTTCAT CATCGGTCACT AAAATCCGTA TCCTTACAG GATATTGTC
 AGTTTCGTCA ATTGCCGATT GTATATCCGA TTTATATTTA TTTTCGGTC GAATCATTG
 AACTTTACA TTTGGATCAT AGTCTAATT CATTGCCTT TTCCAAAATT GAATCCATTG
 TTTTGATTC ACGTAGTTT CTGTATTCTT AAAATAAGTT GGTTCCACAC ATACCAATAC
 ATGCATGTGC TGATTATAAG AATTATCTT ATTATTATT GTCACTTCCG TTGCACGCAT
 AAAACCAACA AGATTTTAT TAATTTTTT ATATTGCATC ATTCCGGCGAA ATCCTTGAGC
 CATATCTGAC AAACTCTTAT TTAATTCTTC GCCATCATAA ACATTTTAA CTGTTAATGT
 GAGAAACAAAC CAACGAACGT TTGGCTTTG TTTAATAACT TCAGCAACAA CCTTTGTGA
 CTGAATGCCA TGTTCATCG CTCTCCTCCA GTTGCACATT GGACAAAGCC TGGATTACA
 AAACCACACT CGATACAACT TTCTTTCGCC TGTTTCACGA TTTTGTTTAT ACTCTAATAT
 TTCAGCACAA TCTTTTACTC TTTCAAGCCTT TTTAAATTCA AGAATATGCA GAAGTTCAA
 GTAATCAACA TTAGCGATTT TCTTTCTCT CCATGGTCTC ACTTTTCCAC TTTTGTC
 GTCCACTAAA ACCCTTGATT TTTCATCTGA ATAAATGCTA CTATTAGGAC ACATAATATT
 AAAAGAAACC CCCATCTATT TAGTTATTTG TTTAGTCACT TATAACTTTA ACAGATGGGG
 TTTTCTGTC CAAACCAATT TAAAGGGTTT CAATACTTA AAACACATAC ATACCAACAC
 TTCAACGCAC CTTTCAGCAA CTAAAATAAA AATGACGTTA TTTCTATATG TATCAAGATA

AGAAAGAAGA AGTTCAAAAC CATCAAAATA AGACACCTTT TCAGGTGCTT TTTTTATTT
 ATAAACTCAT TCCCTGATCT CGACTTCGTT CTTTTTTTAC CTCTCGGTTA TGAGTTAGTT
 CAAATTGTT CTTTTTAGGT TCTAAATCGT GTTTTCTTG GAATTGTGCT GTTTTATCCT
 TTACCTTGTG TACAAACCCC TTAAAPACGT TTTTAAAGGC TTTTAAAGCCG TCTGTACGTT
 CCTTAAG//

SEQ ID No. 5: pNCO-BS-Lusy-C93S

Lumazinsynthase-Gen aus *B. subtilis* in *E. coli* exprimiert. Cystein an Position 93 gegen Serin ersetzt.

SEQUENCE 3879 BP; 1039 A; 902 C; 937 G; 1001 T; 0 OTHER;
 CTCGAGAAAT CATAAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACCATGAAT
 ATCATACAAG GAAATTTAGT TGGTACAGGT CTTAAATCG GAATCGTAGT AGGAAGATTT
 AATGATTTA TTACGAGCAA GCTGCTGAGC GGAGCAGAAG ATGCGCTGCT CAGACATGGC
 GTAGACACAA ATGACATTGA TGTGGCTTGG GTTCCAGGCG CATTGAAAT ACCGTTGCT
 GCGAAAAAAA TGGCGGAAAC AAAAAAATAT GATGCTATTAA TCACATTGGG CACTGTCATC
 AGAGGCGCAA CGACACATTA CGATTATGTT TCGAATGAAG CTGCAAAGG CATCGCGCAA
 GCAGCAAACA CTACTGGTGT ACCTGTCATC TTTGGAATTG TAACAACTGA AAACATCGAA
 CAGGCTATCG AGCGTGCCGG CACAAAAGCG GGCAACAAAG GTGTAGATTG TGCTGTTCT
 GCCATTGAAA TGGCAAATTAA ACCCGCTCA TTTGAATAAG GATCCGTCGA CCTGCAGCCA
 AGCTTAATTA GCTGAGCTT GACTCCTGTT GATAGATCCA GTAATGACCT CAGAACTCCA
 TCTGGATTG TTCAGAACGC TCGGTTGCCG CCGGGCGTTT TTTATTGGTG AGAATCCAAG
 CTAGCTTGGC GAGATTTCA GGAGCTAAGG AAGCTAAAAT GGAGAAAAAA ATCACTGGAT
 ATACCACCGT TGATATATCC CAATGGCATC GTPAAGAACAA TTTTGAGGCA TTTCAGTCAG
 TTGCTCAATG TACCTATAAC CAGACCGTTC AGCTGGATAT TACGGCCTTT TTAAAGACCG
 TAAAGAAAAA TAAGCACAAG TTTTATCCGG CCTTTATTCA CATTCTTGCC CGCCTGATGA
 ATGCTCATCC GGAATTCGTT ATGGCAATGA AAGACGGTGA GCTGGTGATA TGGGATAGTG
 TTCACCCCTG TTACACCGTT TTCCATGAGC AACTGAAAC GTTTTCATCG CTCTGGAGTG
 AATACCACGA CGATTTCCGG CAGTTCTAC ACATATATTC GCAAGATGTG GCGTGTACG
 GTGAAAACCT GGCCTATTTC CCTAAAGGGT TTATTGAGAA TATGTTTTTG GTCTCAGCCA
 ATCCCTGGGT GAGTTTCACC AGTTTGATT TAAACGTGGC CAATATGGAC AACTTCTTCG
 CCCCCGTTT CACCATGCAT GGGCAAATAT TATACGCAAG GCGACAAGGT GCTGATGCCG
 CTGGCGATTC AGGTTCATCA TGCCGCTGT GATGGCTTCC ATGTCGGCAG AATGCTTAAT
 GAATTACACG AGTACTGGCA TGAGTGGCAG GCGGGGGCGT AATTTTTTA AGGCAGTTAT
 TGGTGCCCTT AACCGCCTGG GGTAAATGACT CTCTAGCTTG AGGCATCAA TAAAACGAAA
 GGCTCAGTCG AAGGACTGGG CCTTCTGTT TATCTGTTGT TTGTCGGTGA ACGCTCTCCT
 GAGTAGGACA AATCCGCGC TCTAGAGCTG CCTCGCCGT TTCGGTGATG ACGGTGAAAA
 CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG

CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGG TGTTGGGGGG TGTCGGGGCG CAGCCATGAC
CCAGTCACGT AGCGATAGCG GAGTGTATAC TGGCTTAACG ATGCGGCATC AGAGCAGATT
GTACTGAGAG TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCCTCGCTC ACTGACTCGC TGCCTCGGT CTGTCGGCTG
CGGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GAAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGAT
AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC
GCGTTGCTGG CGTTTTCCA TAGGCTCGC CCCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC
TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCCTT TCCCCCTGGA
AGCTCCCTCG TGCGCTCTCC TGTTCCGACC CTGCCGCTTA CCGGATAACCT GTCCGCCCTT
CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTTCTCAA TGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTCGGTG
TAGGTCGTTG GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGGCC CGACCGCTGC
GCCTTATCCG GTAACTATCG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATGCCCACTG
GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG
CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAAACCACC
GCTGGTAGCG GTGGTTTTTG TGTTGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT
CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AAAACTCACGT
TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATTAA
AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA
TGCTTAATCA CTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTGCTTCATC CATAGCTGCC
TGACTCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGC
GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAAGCCA
GCCGGAAGGG CGGAGCGCAG AAGTGGCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT
AATTGTTGCC GGGAAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTGCG CAACGTTGTT
GCCATTGCTA CAGGCATCGT GGTGTACCGC TCGTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCAAGCTCC
GGTTCCCAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC
TCCTTCGGTC CTCCGATCGT TGTCAAGAAGT AAGTTGCCG CAGTGGTATC ACTCATGGTT
ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GCGGACCGAG TTGCTCTTGC
CCGGCGTCAA TACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAGT GCTCATCATT
GGAAAACGTT CTTGGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTGC
ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTCAC CAGCGTTCT
GGGTGAGCAA AACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA
TGTTGAATAC TCTACTCTT CCTTTTCAA TATTATGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT
CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAATAAACAAATAGG GGTTCCGCGC
ACATTCCCC GAAAAGTGC ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC
TATAAAAATA CGCGTATCAC GAGGCCCTT CGTCTTCAC//

SEQ ID No. 6: pNCO-BS-Lusy-C139S

Lumazinsynthase-Gen aus *B. subtilis* in *E. coli* exprimiert. Cystein an Position 139 gegen Serin ersetzt.

SEQUENCE 3879 BP; 1039 A; 302 C; 937 G; 1001 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAT CATAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATTGTGAGCG CATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAATT AACCATGAAT
 ATCATACAAG CAAATTAGT TGGTACAGGT CTTAAATCG GAATCGTAGT AGGAAGATT
 AATGATTTA TTACGAGCAA GCTGCTGAGC GGAGCAGAAG ATGCGCTGCT CAGACATGGC
 GTAGACACAA ATGACATTGA TGTGGCTTGG GTTCCAGGCG CATTGAAAT ACCGTTGCT
 GCGAAAAAAA TGGCGGAAAC AAAAAAATAT GATGCTATTA TCACATTGGG CACTGTCATC
 AGAGGCGCAA CGACACATTA CGATTATGTC TGCAATGAAG CTGAAAAGG CATCGCGCAA
 GCAGCAAACA CTACTGGTGT ACCTGTCATC TTTGGAATTG TAACAACGTAAACATCGAA
 CAGGCTATCG AGCGTGCCGG CACAAAAGCG GGCAACAAAG GTGTAGATTG AGCTGTTCT
 GCCATTGAAA TGGCAAATTG AAACCGCTCA TTTGAAATAAG GATCCGTCGA CCTGCAGCCA
 AGCTTAATTA GCTGAGCTTG GACTCCTGTT GATAGATCCA GTAATGACCT CAGAACTCCA
 TCTGGATTTG TTCAGAACGC TCGGTTGCCG CCGGGCGTTT TTTATTGGTG AGAATCCAAG
 CTAGCTTGGC GAGATTTCA GGAGCTAAGG AAGCTAAAT GGAGAAAAAA ATCACTGGAT
 ATACCACCGT TGATATATCC CAATGGCATC GTAAAGAACAA TTTTGAGGCA TTTCAGTCAG
 TTGCTCAATG TACCTATAAC CAGACCGTTC AGCTGGATAT TACGGCCTT TTAAAGACCG
 TAAAGAAAAA TAAGCACAAG TTTTATCCGG CCTTTATTCA CATTCTGCC CGCCTGATGA
 ATGCTCATCC GGAATTTCGT ATGGCAATGA AAGACGGTGA GCTGGTGATA TGGGATAGTG
 TTACCCCTTG TTACACCGTT TTCCATGAGC AAACGTAAAC GTTTCATCG CTCTGGAGTG
 AATACACCGA CGATTTCCGG CAGTTCTAC ACATATATTC GCAAGATGTG GCGTGTACG
 GTGAAAACCT GGCCTATTTC CCTAAAGGGT TTATTGAGAA TATGTTTTTC GTCTCAGCCA
 ATCCCTGGGT GAGTTTCACC AGTTTGATT TAAACGTGGC CAATATGGAC AACTTCTTCG
 CCCCCGTTTT CACCATGCAT GGGCAAATAT TATACGCAAG GCGACAAGGT GCTGATGCCG
 CTGGCGATTC AGGTTCATCA TGCCGCTGT GATGGCTTCC ATGTCGGCAG AATGCTTAAT
 GAATTACAAC AGTACTGCGA TGAGTGGCAG GGCAGGGCGT AATTTTTTA AGGCAGTTAT
 TGGTGCCCTT AAACGCCTGG GGTAAATGACT CTCTAGCTTG AGGCATCAAA TAAACGAAA
 GGCTCAGTCG AAAGACTGGG CCTTTCGTTT TATCTTTGT TTGTCGGTGA ACGCTCTCCT
 GAGTAGGACA AATCCGCCGC TCTAGAGCTG CCTGGCGCGT TTGCGGTGATG ACGGTGAAA
 CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG
 CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG TGTGCGGG TGTGCGGGCG CAGCCATGAC
 CCAGTCACGT AGCGATAGCG GAGTGTATAC TGGCTTAACG ATGCGGCATC AGAGCAGATT
 CTACTGAGAG TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
 CGCATCAGGC GCTCTCCGC TTCCTCGCTC ACTGACTCGC TGCCTCGGT CTGTCGGCTG
 CGGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCATAAGGC GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT
 AACGCAGGA AGAACATGTG AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC
 CGGTTGCTGG CGTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCCGACG AGCATCACAA AAATCGACGC
 TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAGAT ACCAGGGCGTT TCCCCCTGGA
 AGCTCCCTCG TGCCTCTCC TGTTCCGACC CTGCGCTTA CGGGATACCT GTCCGGCTTT
 CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTCTCAA TGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTGGTG

TAGGTCGTTG GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAAACCCC CGCTTCAGCC CGACCGCTGC
 GCCTTATCCG GTAACATATCG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG
 GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
 TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCCTCTG
 CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAAACCACC
 GCTGGTAGCG GTGGTTTTT TGTGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT
 CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AAAACTCACGT
 TAAGGGATTG TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATTAA
 AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA
 TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTGCTTCATC CATAGCTGCC
 TGACTCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT
 GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA
 GCCGGAAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT
 AATTGTTGCC GGGAAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTGCC CAACGTTGTT
 GCCATTGCTA CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTG GTATGGCTTC ATTCAAGCTCC
 GGTTCCCAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC
 TCCTTCGGTC CTCCGATCGT TGTGAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTATC ACTCATGGTT
 ATGGCAGCAC TGCATAATTTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
 GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCAGCCGAG TTGCTCTTGC
 CCGCGTCAA TACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAGT GCTCATCATT
 GGAAAACGTT CTTGGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG
 ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCACCATCTT TTACTTTCAC CAGCGTTCT
 GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA
 TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT
 CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCCGGCG
 ACATTCCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC
 TATAAAAATA GCGTATCAC GAGGCCCTT CGTCTTCAC//

SEQ ID No.7: pNCO-BS-Lusy-C93/139S

Lumazinsynthase-Gen aus *B. subtilis* in *E. coli* exprimiert. Cystein an Position 93 und 139 gegen Serin ersetzt.

SEQUENCE 3879 BP; 1039 A; 902 C; 937 G; 1001 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAT CATAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCAATTAAAG AGGAGAAATT AACCATGAAT
 ATCATACAAG GAAATTTAGT TGGTACAGGT CTTCATAATCG GAATCGTAGT AGGAAGATTT
 AATGATTTA TTACGAGCAA GCTGCTGAGC GGAGCAGAAG ATGCGCTGCT CAGACATGGC
 GTAGACACAA ATGACATTGA TGTGGCTTGG GTTCCAGGGCG CATTGAAAT ACCGTTGCT
 GCGAAAAAAA TGGCGGAAAC AAAAATAT GATGCTATTA TCACATTGGG CACTGTCATC

AGAGGGCGCAA CGACACATTA CGATTATGTT TCGAATGAAG CTGCAAAAGG CATCGCGCAA
 GCAGCAAACA CTACTGGTGT ACCTGTGATC TTTGGAATTG TAACAACTGA AAACATCGAA
 CAGGCTATCG AGCGTGCAGG CACAAAAGCG GGCAACAAAG GTGTAGATTG AGCTGTTCT
 GCCATTGAAA TGGCAAATTG AAACCGCTCA TTTGAATAAG GATCCGTCGA CCTGCAGCCA
 AGCTTAATTA GCTGAGCTTG GACTCTGTT GATAGATCCA GTAATGACCT CAGAACTCCA
 TCTGGATTG TTCAGAACGC TCGGTTGCCG CCGGGCGTTT TTTATTGGTG AGAATCCAAG
 CTAGCTGGC GAGATTTCA GGAGCTAAGG AAGCTAAAAT GGAGAAAAAA ATCACTGGAT
 ATACCACCGT TGATATATCC CAATGGCATE GTAAAGAACAA TTTTGAGGCA TTTCAGTCAG
 TTGCTCAATG TACCTATAAC CAGACCGTTC AGCTGGATAT TACGGCCTTT TTAAAGACCG
 TAAAGAAAAAA TAAGCACAAG TTTTATCCGG CCTTTATTCA CATTCTTGCC CGCCTGATGA
 ATGCTCATCC GGAATTTCGT ATGGCAATGA AAGACGGTGA GCTGGTGATA TGGGATAGTG
 TTCACCCTTG TTACACCGTT TTCCATGAGC AAACTGAAAC GTTTCATCG CTCTGGAGTG
 AATACCACGA CGATTTCCGG CAGTTCTAC ACATATATTC GCAAGATGTG GCGTGTACG
 GTGAAAACCT GGCCTATTTC CCTAAAGGGT TTATTGAGAA TATGTTTTTC GTCTCAGCCA
 ATCCCTGGGT GAGTTTCACC AGTTTGATT TAAACGTGGC CAATATGGAC AACTTCTCG
 CCCCCGTTT CACCATGCAT GGGCAAATAT TATACGCAAG GCGACAAAGGT GCTGATGCCG
 CTGGCATTTC AGGTTCATCA TGCCGTCTGT GATGGCTTCC ATGTCGGCAG AATGCTTAAT
 GAATTACAAC AGTAATGCGA TGAGTGGCAG GGCGGGCGT AATTTTTTA AGGCAGTTAT
 TGGTGCCCTT AAACGCTGG GGTAATGACT CTCTAGCTTG AGGCATCAA TAAAACGAAA
 GGCTCAGTCG AAAGACTGGG CCTTCGTTT TATCTGTTGT TTGTCGGTGA ACGCTCTCCT
 GAGTAGGACA AATCCGCCGC TCTAGAGCTG CCTCGCGCGT TTGCGGTGATG ACGGTGAAAA
 CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT CTGTAAGCGG ATGCCGGAG
 CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG TGTTGGCGGG TGTCGGGGCG CAGCCATGAC
 CCAGTCACGT AGCGATAGCG GAGTGTATAC TGGCTTAAC ATGCGGCATC AGAGCAGATT
 GTACTGAGAG TGCACCATAT GCGGTGTCAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
 CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCCCTCGCTC ACTGACTCGC TCGCGCTCGT CTGTCGGCTG
 CGGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGGT GAAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGAT
 AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC CAGCAAAGG CCAGGAACCG TAAAAGGCC
 GCGTTGCTGG CGTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC
 TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAAAGAT ACCAGGCCTT TCCCCCTGGA
 AGCTCCCTCG TCGCCTCTCC TGTTCCGACC CTGCCGCTTA CGGGATACCT GTCCGCCCTT
 CTCCCTCGG GAAGCGTGGC GCTTCGAA TGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG
 TAGGTCGTTG GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAAACCC CGCTTCAGCC CGACCGCTGC
 GCCTTATCCG GTAATCTCG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG
 GCAGCAGGCCA CTGCTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
 TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG
 CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAAACCACC
 GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTTGCAAG CAGCAGATTA CGCCAGAA AAAAGGATCT
 CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGAA AAACTCACGT
 TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAGAA AGGATCTCA CCTAGATCCT TTTAAATTAA
 AAATGAAGTT TTAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA
 TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTGCTTCATC CATAGCTGCC

TGACTCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT
 GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA
 GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT
 AATTGTTGCC GGGAAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTGCG CAACGTTGTT
 GCCATTGCTA CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTG GTATGGCTTC ATTCAAGCTCC
 GGTTCCCAAC GATCAAGGGC AGTTACATGA TCCCCCATGT TGTGAAAAAA AGCGGTTAGC
 TCCTTCGGTC CTCCGATCGT TGTCAAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTATTC ACTCATGGTT
 ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
 GGTGAGTACT CAAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGGGACCGAG TTGCTCTTGC
 CCGGCGTCAA TACGGGATAA TACCGGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT
 GGAAAACGTT CTTGGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG
 ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTCAC CAGCGTTCT
 GGGTGAGCAA AACAGGAAAG GCAAAATGCC GCAAAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA
 TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT
 CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAATAAACAAATAGG GGTTCCGCGC
 ACATTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC
 TATAAAAATA GCGTATCAC GAGGCCCTT CGTCTTCAC//

SEQ ID No. 8: pNCO-N-BS-Lusy

Expressionsvektor zur N-terminalen Fusion von Fremdproteinen an die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*

SQ SEQUENCE 3912 BP; 1042 A; 911 C; 951 G; 1008 T; 0 OTHER;
 CTCGAGAAAT CATAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGGCG
 GCGGCGCGTA GCTGCGCGC CGCTATGAAT ATCATAACAAG GAAATTTAGT TGGTACAGGT
 CTTAAAATCG GATCGTAGT AGGAAGATTT AATGATTTA TTACGAGCAA GCTGCTGAGC
 GGAGCAGAAG ATGCGCTGCT CAGACATGGC GTAGACACAA ATGACATTGA TGTGGCTTGG
 GTTCCAGGCG CATTGAAAT ACCGTTTGCT GCGAAAAAAA TGGCGGAAAC AAAAAAATAT
 GATGCTATTA TCACATTGGG CACTGTCATC AGAGGCGCAA CGACACATTA CGATTATGTC
 TGCAATGAAG CTGCAAAAGG CATCGCGCAA GCAGCAAACA CTACTGGTGT ACCTGTCATC
 TTTGGAATTG TACAAACTGA AACATCGAA CAGGCTATCG AGCGTGCCGG CACAAAAGCG
 GGCAACAAAG GTGTAGATTG TGCTGTTCT GCCATTGAAA TGGCAAATT AAACCGCTCA
 TTTGAATAAT TTGGATCCGT CGACCTGCAG CCAGCTTAA TTAGCTGAGC TTGGACTCCT
 GTTGATAGAT CCAGTAATGA CCTCAGAACT CCATCTGGAT TTGTTCAGAA CGCTCGGTTG
 CCGCCGGCG TTTTTATTG GTGAGAATCC AAGCTAGCTT GGGGAGGATT TCAGGAGCTA
 AGGAAGCTAA AATGGAGAAA AAAATCACTG GATATACCAC CGTTGATATA TCCCAATGGC
 ATCGTAAAGA ACATTTGAG CCATTTCACT GAGTTGCTCA ATGTACCTAT AACCAAGACCG
 TTCAGCTGGA TATTACGGCC TTTTAAAGA CCGTAAGAA AAATAAGCAC AAGTTTATC

CGGCCTTAT TACACATTCTT GCCCCGCTGA TGAATGCTCA TCCGGAATT CGTATGGCAA
 TGAAAGACGG TGGCTGGTG ATATGGGATA GTGTTCACCC TTGTTACACC GTTTCCATG
 AGCAAACCTGA AACGTTTCA TCGCTCTGGA GTGAATACCA CGACGATTTC CGGCAGTTTC
 TACACATATA TTGCAAGAT GTGGCGTGT ACGGTGAAGA CCTGGCCTAT TTCCCTAAAG
 GGTTTATTGA GATATGTTT TTGCTCTGAG CCAATCCCTG GGTGAGTTTC ACCAGTTTG
 ATTTAACGT GCGCAATATG GACAACCTCT TCGCCCCGT TTTCACCATG CATGGGCAA
 TATTATACGC AAGGCGACAA GGTGCTGATG CCGCTGGCGA TTCAGGTTCA TCATGCCGTC
 TGTGATGGCT TCCATGTCGG CAGAATGCTT AATGAATTAC AACAGTACTG CGATGAGTGG
 CAGGGCGGGG CGTAATTGTT TTAGGCAGT TATTGGTGCCT TAAACGCC TGGGGTAATG
 ACTCTCTAGC TTGAGGCATC AAATAAAACG AAAGGCTCAG TCGAAAGACT GGGCCTTCG
 TTTTATCTGT TGTGTTGTCGG TGAACGCTCT CCTGAGTAGG ACAAAATCCGC CGCTCTAGAG
 CTGCCTCGCG CGTTTCGGTG ATGACGGTGA AAACCTCTGA CACATGCAGC TCCCGGAGAC
 GGTCACAGCT TGTCTGTAAG CGGATGCCGG GAGCAGACAA GCCCGTCAGG GCGCGTCAGC
 GGGTGTGGC GGGTGTGGG GCGCAGCCAT GACCCAGTCA CGTAGCGATA GCGGAGTGT
 TACTGGCTTA ACTATGCCGC ATCAGAGCAG ATTGTACTGA GAGTGCACCA TATGCGGTGT
 GAAATACCGC ACAGATGCGT AAGGAGAAAA TACCGCATCA GGCCTCTTC CGCTTCCTCG
 CTCACTGACT CGCTGCGCTC GGTCTGTCGG CTGCGCGAG CGGTATCAGC TCACTCAAAG
 GCGGTAATAC GGTTATCCAC AGAACATCAGGG GATAACGCAG GAAAGAACAT GTGAGCAAA
 GGCCAGCAAA AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG GCGCGTTGC TGGC GTTTT CCATAGGCTC
 CGCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAAATCGA CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG AAACCCGACA
 GGACTATAAA GATACCAGGC GTTCCCCCT GGAAGCTCCC TCGTGCCTC TCCTGTTCCG
 ACCCTGCCGC TTACCGGATA CCTGTCGGCC TTTCTCCCTT CGGGAAAGCGT GGCGCTTTCT
 CAATGCTCAC GCTGTAGGTA TCTCAGTTCG GTGTAGGTCG TTGCTCCAA GCTGGGCTGT
 GTGCACGAAC CCCCCGTTCA GCCCGACCGC TGCGCCTTAT CCGGTAACCA TCGTCTTGAG
 TCCAACCCGG TAAGACACGA CTTATGCCA CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGGATTAGC
 AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA CTACGGCTAC
 ACTAGAAGGA CAGTATTTGG TATCTGCCGT CTGCTGAAGC CAGTTACCTT CGGAAAAAGA
 GTTGGTAGCT CTTGATCCGG CAAACAAACC ACCGCTGGTA GCGGTGGTT TTTGTTGC
 AAGCAGCAGA TTACGCGCAG AAAAAAAAGGA TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT CTTTCTACG
 GGGTCTGACG CTCAGTGGAA CGAAAACCTCA CGTTAAGGGGA TTTTGGTCAT GAGATTATCA
 AAAAGGATCT TCACCTAGAT CCTTTAAAT TAAAAATGAA GTTTAAATC AATCTAAAGT
 ATATATGAGT AAACCTGGTC TGACAGTTAC CAATGCTTAA TCAGTGAGGC ACCTATCTCA
 GCGATCTGTC TATTCGTTA ATCCATAGCT GCCTGACTCC CCGTCGTGTA GATAACTACG
 ATACGGGAGG GCTTACCATC TGGCCCCAGT GCTGCAATGA TACCGCGAGA CCCACGCTCA
 CCGGCTCCAG ATTTATCAGC AATAAACCG AGCCAGGGAA GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT
 CCTGCAACTT TATCCGCTC CATCCAGTCT ATTAATTGTT GCCGGGAAGC TAGAGTAAGT
 AGTTGCCAG TTAATAGTTT GCGCAACGTT GTGCCATTG CTACAGGCAT CGTGGTGTCA
 CGCTCGTGT TTGGTATGGC TTCATTGAGC TCCGGTTCCC AACGATCAAG GCGAGTTACA
 TGATCCCCCA TGTTGTGCAA AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG GTCCCTCCGAT CGTTGTGAGA
 AGTAAGTTGG CGGCAGTGTGTT ATCACTCATG GTTATGGCAG CACTGCATAA TTCTCTTACT
 GTCATGCCAT CGCTAAGATG CTTTCTGTC ACTGGTGAAGT ACTCAACCAA GTCATTCTGA
 GAATAGTGTGTA TCGGGCGACC GAGTTGCTCT TGCCCGCGT CAATACGGGA TAATACCGCG

CCACATAGCA GIACTTTAAA AGTGCTCATC ATTGGAAAAC GTTCTTCGGG GCGAAAACTC
 TCAAGGATCT TACCGCTGTT GAGATCCAGT TCGATGTAAC CCACTCGTGC ACCCAACTGA
 TCTTCAGCAT CTTTTACTTT CACCAGCGTT TCTGGGTGAG CAAAAACAGG AAGGCAAAAT
 GCCGCAAAAA AGGGAATAAG GGCACACAGG AAATGTTGAA TACTCATACT CTTCCCTTTT
 CAATATTATT CAAGCATTAA TCAGGGTTAT TGTCTCATGA GCGGATACAT ATTTGAATGT
 ATTTAGAAAA ATAAACATPAT AGGGGTTCCG CGCACATTTC CCCGAAAGT GCCACCTGAC
 GTCTAAGAAA CCATTATTAT CATGACATTA ACCTATAAAA ATAGGCGTAT CACGAGGCC
 TTTCGTCTTC AC//

SEQ ID No. 9: pNCO-C-BS-Lusy

Expressionsvektor zur C-terminalen Fusion von Fremdproteinen an die Lumazinsynthase aus *B. subtilis*

SEQUENCE 3900 BP; 1046 A; 906 C; 942 G; 1006 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGAAT
 ATCATACAAG GAAATTTAGT TGGTACAGGT CTTAAAATCG GAATCGTAGT AGGAAGATTT
 AATGATTTA TTACGAGCAA GCTGCTGAGC GGAGCAGAAG ATGCGCTGCT CAGACATGGC
 GTAGACACAA ATGACATTGA TGTGGCTTGG GTTCCAGGCG CATTGAAAT ACCGTTTGCT
 GCGAAAAAAA TGGCGGAAAC AAAAATAT GATGCTATTA TCACATTGGG CACTGTCATC
 AGAGGCGCAA CGACACATTA CGATTATGTC TGCAATGAAG CTGCAAAAGG CATCGCGCAA
 GCAGCAAACA CTACTGGTGT ACCTGTCATC TTTGGAATTG TAACAATGTA AAACATCGAA
 CAGGCTATCG AGCGTGCCGG CACAAAAGCG GGCAACAAAG GTGTAGATTG TGCTGTTCT
 GCCATTGAAA TGGCAATTAA AACCGCTCA TTTGAAATTAG CGGCCGCAA CAGTTAAAAA
 GGATCCGTG ACCTGCAGCC AAGCTTAATT AGCTGAGCTT GGACTCCTGT TGATAGATCC
 AGTAATGACC TCAGAACTCC ATCTGGATT GTTCAGAACG CTCGGTTGCC GCGGGCGTT
 TTTTATTGGT GAGAATCCAA GCTAGCTTGG CGAGATTTTC AGGAGCTAAG GAAGCTAAAA
 TGGAGAAAAA ATCACTGGA TATACCACCG TTGATATATC CCAATGGCAT CGTAAAGAAC
 ATTTGAGGC ATTCAGTCA GTTGCTCAAT GTACCTATAA CCAGACCGTT CAGCTGGATA
 TTACGGCCTT TTTAAAGACC GTAAAGAAAA ATAAGCACAA GTTTTATCCG GCCTTTATTC
 ACATTCTTGC CGGCCTGATG AATGTCATC CGGAATTCG TATGGCAATG AAAGACGGTG
 AGCTGGTGAT ATGGGATAGT GTTCACCCCTT GTTACACCGT TTTCCATGAG CAAACTGAAA
 CGTTTCATC CCTCTGGAGT GAATACCACG ACGATTCCG GCAGTTCTA CACATATATT
 CGCAAGATGT CGCGTGTAC GGTGAAACCC TGGCCTATTT CCCTAAAGGG TTTATTGAGA
 ATATTTTTT CGTCTCAGCC AATCCCTGGG TGAGTTTCAC CAGTTTGAT TTAAACGTGG
 CCAATATGGA CAACTTCTTC GCCCCCGTT TCACCATGCA TGGGCAAATA TTATACGCAA
 GGCGACAAGG TGCTGATGCC GCTGGCGATT CAGGTTCATC ATGCCGTCTG TGATGGCTTC
 CATGTCGGCA GAATGCTTAA TGAATTACAA CAGTACTGCG ATGAGTGGCA GGGCGGGCG
 TAATTTTTT AAGGCAGTTA TTGGTGCCTT TAAPCGCCTG GGGTAATGAC TCTCTAGCTT

GAGGCATCAA ATAAARCGAA AGGCTCAGTC GAAAGACTGG CCCTTTCGTT TTATCTGTTG
 TTTGTCGGTG AACGCTCTCC TGAGTAGGAC AAATCCGCCG CTCTAGAGCT GCCTCGCGCG
 TTTCGGTGAT GACGGTAAAA ACCTCTGACA CATGCAGCTC CCGGAGACGG TCACAGCTTG
 TCTGTAAGCG GATGCCGGGA GCAGACAAGC CCGTCAGGGC CCGTCAGCGG GTGTTGGCGG
 GTGTCGGGGC GCAGCCATGA CCCAGTCACG TAGCGATAGC GGAGTGTATA CTGGCTTAAC
 TATGCCGCAT CAGAGCAGAT TGTACTGAGA GTGCACCATA TCGGGTGTGA AATACCGCAC
 AGATGCGTAA GGAGAAAATA CCGCATCAGG CGCTCTCCG CTTCCTCGCT CACTGACTCG
 CTGCGCTCGG TCTGTCGGCT GCGGCCAGCG GTATCAGCTC ACTCAAAGGC GGTAATAACGG
 TTATCCACAG AATCAGGGGA TAACGCAGGA AAGAACATGT GAGCAAAAGG CCAGCAAAAG
 GCCAGGAACC GTAAAAAGGC CGCGTTGCTG GCGTTTTCC ATAGGCTCCG CCCCCCTGAC
 GAGCAGTACA AAAATCGACG CTCAAGTCAG AGGTGGCGAA ACCCGACAGG ACTATAAAAGA
 TACCAAGCGT TTCCCCCTGG AAGCTCCCTC GTGCGCTCTC CTGTTCCGAC CCTGCCGCTT
 ACCGGATACC TGTCCGCCTT TCTCCCTTCG GGAAGCGTGG CGCTTTCTCA ATGCTCACGC
 TGTAGGTATC TCAGTTGGT GTAGGTCGTT CGCTCCAAGC TCGGCTGTGT GCACGAACCC
 CCCGTTTCAGC CCGACCGCTG CGCCTTATCC GGTAACTATC GTCTTGAGTC CAACCCGGTA
 AGACACGACT TATGCCACT GGCAGCAGCC ACTGGTAACA GGATTAGCAG AGCGAGGTAT
 GTAGGGCGTC CTACAGAGTT CTTGAAGTGG TGGCCTAACT ACGGCTACAC TAGAAGGACA
 GTATTTGGTA TCTGCGCTCT GCTGAAGCCA GTTACCTTCG GAAAAAGAGT TGGTAGCTCT
 TGATCCGGCA AACAAACAC CGCTGGTAGC GGTGGTTTT TTGTTTGCAA GCAGCAGATT
 ACGCGCAGAA AAAAAGGATC TCAAGAAGAT CCTTGATCT TTTCTACGGG GTCTGACGCT
 CAGTGGAACG AAAACTCACG TTAAGGGATT TTGGTCATGA GATTATCAAA AAGGATCTTC
 ACCTAGATCC TTTAAATTAA AAAATGAAGT TTTAAATCAA TCTAAAGTAT ATATGAGTAA
 ACTTGGTCTG ACAGTTACCA ATGCTTAATC AGTGAGGCAC CTATCTCAGC GATCTGTCTA
 TTTCGTTCAT CCATAGCTGC CTGACTCCCC GTCGTGTAGA TAACTACGAT ACGGGAGGGC
 TTACCATCTG GCCCCAGTGC TGCAATGATA CCGCGAGACC CACGCTCACC GGCTCCAGAT
 TTATCAGCAA TAAACCAGCC AGCCGGAAAGG GCGGAGCGCA GAAGTGGTCC TGCAACTTTA
 TCCGCCTCCA TCCAGTCTAT TAATTGTTGC CGGGAAGCTA GAGTAAGTAG TTGCCAGTT
 AATAGTTGC GCAACGTTGT TGCCATTGCT ACAGGCATCG TGGTGTACG CTCGTCGTTT
 GGTATGGCTT CATTCAAGCTC CGGTTCCCAA CGATCAAGGC GAGTTACATG ATCCCCCATG
 TTGTGCAAAA AAGCGGTTAG CTCCCTCGGT CCTCCGATCG TTGTCAGAAG TAAAGTTGGCC
 GCAGTGTAT CACTCATGGT TATGGCAGCA CTGCATAATT CTCTTACTGT CATGCCATCC
 GTAAGATGCT TTTCTGTGAC TGGTGTAGTAC TCAACCAAGT CATTCTGAGA ATAGTGTATG
 CGGCGACCGA GTTGCCTTGT CCCGGCGTCA ATACGGGATA ATACCGCGCC ACATAGCAGA
 ACTTTAAAAG TGCTCATCAT TGGAAAACGT TCTTCGGGC GAAAACCTCTC AAGGATCTTA
 CCGCTGTTGA GATCCAGTTC GATGTAACCC ACTCGTGCAC CCAACTGATC TTCAGCATCT
 TTTACTTTCA CCAGCGTTTC TGGGTGAGCA AAGACAGGAA GGCAAAATGC CGCAAAAAG
 GGAATAAGGG CGACACGGAA ATGTTGAATA CTCAACTCTC TCCCTTTTCA ATATTATTGA
 AGCATTATC AGGGTTATTG TCTCATGAGC GGATACATAT TTGAATGTAT TTAGAAAAAT
 AAACAAATAG GGGTTCCCGCG CACATTTCCC CGAAAGTGC CACCTGACGT CTAAGAAACC
 ATTATTATCA TGACATTAAC CTATAAAAAT AGGCSTATCA CGAGGCCCTT TCGTCTTCAC//'

SEQ ID No.10: pNCO-EC-DHFR-BS-Lusy

pNCO-N-BS-Lusy mit DHFR-Gen aus Escherichia coli

SEQUENCE 4368 BP; 1158 A; 1020 C; 1078 G; 1112 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTGATTAAG AGGAGAAATT AACTATGATC
AGTCTGATTG CGGCCTTGC GGTAGATCGC GTTATCGGCA TGAAAACGC CATGCCGTGG
AACCTGCCTG CCGATCTCGC CTGGTTAAA CGAACACACCT TAAATAAACCG CGTGATTATG
GGCCGCCATA CCTGGGAATC AATCGGTCT CCGTTGCCAG GACGCAAAAAA TATTATCCTC
AGCAGTCAAC CGGGTACCGA CGATCGCGTA ACGTGGTGA AGTCGGTGG AAGGCCATC
GCGCGTGTG GTGACGTACC AGAAATCATG GTGATTGGCG GCGGTGCGT TTATGAACAG
TTCTTGCCAA AAGCGCAAAA ACTGTATCTG ACGCATATCG ACGCAGAAGT GGAAGGCGAC
ACCCATTTC CCGATTACGA GCCGGATGAC TCGGAATCGG TATTCAAGCGA ATTCCACGAT
GCTGATGCGC AGAACTCTCA CAGCTATTGC TTTGAGATTG TGGAGCGGCG TGCGGCCGCT
ATGAATATCA TACAAGGAAA TTTAGTTGCT ACAGGTCTTA AAATCGGAAT CGTAGTAGGA
AGATTTAATG ATTTTATTAC GAGCAAGCTG CTGAGCGGAG CAGAAGATGC GCTGCTCAGA
CATGGCGTAG ACACAAATGA CATTGATGTG CTTGGGTTC CAGGCGCATT TGAAATACCG
TTTGTGCGA AAAAAATGGC GGAAACAAAAA AAATATGATG CTATTATCAC ATTGGCACT
GTCATCAGAG GCGCAACGAC ACATTACGAT TATGTCTGCA ATGAAGCTGC AAAAGGCATC
GCGCAAGCAG CAAACACTAC TGGTGTACCT GTCATCTTG GAATTGTAAC AACTGAAAAC
ATCGAACAGG CTATCGAGCG TGCCGGCACA AAAGCGGGCA ACAAAAGGTGT AGATTGTGCT
GTTTCTGCCA TTGAAATGGC AAATTTAAC CGCTCATTTG AATAATTG ATCCGTCGAC
CTGCAGCCAA GCTTAATTAG CTGAGCTTGG ACTCCTGTTG ATAGATCCAG TAATGACCTC
AGAACTCCAT CTGGATTGT TCAGAACGCT CGGTTGCCGC CGGGCGTTTT TTATTGGTGA
GAATCCAAGC TAGCTTGGCG AGATTTCAAG GAGCTAAGGA AGCTAAAATG GAGAAAAAAA
TCACTGGATA TACCACCGTT GATATATCCC ATGGCATCG TAAAGAACAT TTGAGGCAT
TTCAGTCAGT TGCTCAATGT ACCTATAACC AGACCGTTCA GCTGGATATT ACGGCCTTTT
TAAAGACCCTT AAAGAAAAAT AAGCACAAGT TTATCCGGC CTTTATTCAC ATTCTGCC
GCCTGATGAA TGCTCATCCG GAATTCGTA TGGCAATGAA AGACGGTGAG CTGGTGTAT
GGGATAGTGT TCACCCCTGT TACACCGTTT TCCATGAGCA AACTGAAACG TTTTCATCGC
TCTGGAGTGA ATACCACGAC GATTTCCGGC AGTTTCTACA CATATATTG CAAGATGTGG
CGTGTACGG TGAAACCTG GCCTATTCC CTAAAGGGTT TATTGAGAAT ATGTTTTCG
TCTCAGCCAA TCCCTGGGTG AGTTTCACCA GTTTGATTT AAACGTGGCC AATATGGACA
ACTTCTCGC CCCCCTTTC ACCATGCATG GCAAATATT ATACGCAAGG CGACAAGGTG
CTGATGCCGC TGGCGATTCA GGTCATCAT GCCGTCGTG ATGGCTTCCA TGCGGCAGA
ATGCTTAATG AATTACAACA GTACTGCGAT GAGTGGCAGG GCGGGGCGTA ATTTTTTAA
GGCAGTTATT GGTGCCCTTA AACGCCTGGG GAAATGACTC TCTAGCTTGA GGCATCAAAT
AAAACGAAAG GCTCAGTCGA AAGACTGGGC CTTCGTTTT ATCTGTTGTT TGTCGGTGAA
CGCTCTCCTG AGTAGGACAA ATCCGCCGCT CTAGAGCTGC CTCGCGCGTT TCGGTGATGA
CGGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GAGACGGTC ACAGCTTGTG TGTAAGCGGA
TGCCGGGAGC AGACAAGCCC GTCAGGGCGC GTCAGCGGGT GTTGGCGGGT GTCGGGGCGC
AGCCATGACC CAGTCACGTA GCGATAGCGG ATGTATACT GCCTTAACCA TGCGGCATCA
GAGCAGATTG TACTGAGAGT GCACCATATG CGGTGTGAAA TACCGCACAG ATGCGTAAGG

AGAAAATACCGCATCAGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTC
 TGTCGGCTGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAA
 TCAGGGGATAACGCAGGAAA GAACATGTGA GCAAAGGCCAGCAAAAGGC CAGGAACCGT
 AAAAAGGCCGCGTTGCTGGC GTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGA GCATCACAAA
 AATCGACGCTCAAGTCAGAG GTGGCGAACCGACAGGAC TATAAAAGATA CCAGGCCTT
 CCCCCCTGGAA GCTCCCTCGTGCCTCGTCTTCCCTGTTCCGACCC TGCCGCTTACCGGATAACCTG
 TCCGCCTTTC TCCCTCGGGAAAGCGTGGCGCTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTC
 AGTTCGGTGTAGGTGTTCGCTCCAAGCTGGCTGTGCACGAACCCCCCGTTCAAGCCC
 GACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATACGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTA
 TCGCCACTGGCAGCAGCCAC TGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCCTGCT
 ACAGAGTTCTGTAAAGTGGTGCGCTTACTACGGCTACACTGAAGGACAGTATTTGGTATC
 TGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGA AAAAGAGTTGTAGCTCTTGAATCCGGCAAA
 CAAACCACCGCTGGTAGCGGTTGGTTTTTTGTGCAAGCACCAGATTACGCGCAGAAAA
 AAAGGATCTCAAGAAGATCTCTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAAGGGAA
 AACTCACGTTAAGGGATTCTGTGATGAGATTATCAACGGTACACTAAGGACAGTCTAGATCCT
 TTAAATTAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGAC
 AGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTTATTTCGTTCATCC
 ATAGCTGCCTGACTCCCCGTCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGC
 CCCAGTGCTGCAATGATACCGAGACCCACGCTCACCCGCTCCAGATTATCAGCAATA
 AACCAAGCCAGCGGAAGGGCGAGCGCAGAGTGGTCCTGCAACTTTATC CGCCTCCATC
 CAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAAGTAGTTGCCAGTTAAAGTTGCGC
 AACGTTGTTGCTACAGGCATCGTGCTGACGCTCGTCTTGGTATGGCTTCA
 TTCAGCTCCGGTCCACGATCAAGGCGAGTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAGAA
 GCGGTTAGCTCCTCGGTCCCTCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCCGAGTGGTATCA
 CTCATGGTTAAGGCAGCAACTAATTCTCTTACTGTCA TGCCATCCGTAAAGATGCTTT
 TCTGTGACTGTTGAGTACTCAACCAAGTCA TTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGT
 TGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACTTAAAAGTG
 CTCATCATTGAAAAACGTTCTCGGGGCGAAGACTCTCAA GGATCTTACCGTGTGAGA
 TCCAGTTCGATGAAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACC
 AGCGTTCTGGTGAGCAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAGGGATAAAGGGCG
 ACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTCAATTATTGAAGCATTTATCAG
 GGTTATTGTCATGAGCGGATACATATTGAAATGTATTTAGAAAAATACAACAAATAGGG
 GTTCCCGCGCACTTCCCCGAAAAGTGCCTGACGCTAAAGAACCATATTATCATG
 ACATTAACCTATAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTCTGCTTCAC//

SEQ ID No.11: pNCO-EC-MBP-BS-Lusy

pNCO-N-BS-Lusy mit Gen für das Maltose bindende Protein (MBP) aus Escherichia coli

SEQUENCE 5064 BP; 1385 A; 1189 C; 1250 G; 1240 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAT CATAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTGATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGAAA
 ATCGAAGAAG GTAAACTGGT AATCTGGATT AACGGCGATA AAGGCTATAA CGGTCTCGCT
 GAAGTCGGTA AGAAATTGCA GAAAGATACC GGAATTAAAG TCACCGTTGA GCATCCGGAT
 AAACTGGAAG AGAAATTCCC ACAGGTTGCG GCAACTGGCG ATGGCCCTGA CATTATCTTC
 TGGGCACACG ACCGCTTTGG TGGCTACGCT CAATCTGCC TGTGGCTGA AATCACCCCG
 GACAAAGCGT TCCAGGACAA GCTGTATCCG TTTACCTGGG ATGCCGTACG TTACAACGGC
 AAGCTGATTG CTTACCGAT CGCTGTTGAA GCGTTATCGC TGATTATCAA CAAAGATCTG
 CTGCCGAACC CGCCAAAAAC CTGGGAAGAG ATCCCGGCGC TGGATAAAAGA ACTGAAAGCG
 AAAGGTAAGA GCGCGCTGAT GTTCAACCTG CAAGAACCGT ACTTCACCTG CCCGCTGATT
 GCTGCTGACG GGGTTATGC GTTCAAGTAT GAAAACGGCA AGTACGACAT TAAAGACGTG
 GGCCTGGATA ACGCTGGCGC GAAAGCGGGT CTGACCTTCC TGGTTGACCT GATTAAAAC
 AAACACATGA ATGCAGACAC CGATTACTCC ATCGCAGAAG CTGCCCTTAA TAAAGGCGAA
 ACAGCGATGA CCATCAACGG CCCGTGGCA TGGTCCAACA TCGACACCAG CAAAGTGAAT
 TATGGTGTAA CGGTACTGCC GACCTCAAG GGTCAACCAT CCAAACCGTT CGTTGGCGTG
 CTGAGCGCAG GTATTAACGC CGCCAGTCG AACAAGAGC TGGCAAAAGA GTTCTCGAA
 AACTATCTGC TGACTGATGA AGGTCTGGAA GCGGTTAATA AAGACAAACC GCTGGGTGCC
 GTAGCCCTGA AGTCTTACGA GGAAGAGTTG CGAAAGATC CACGTATTGC CGCCACCATG
 GAAAACGCC AGAAAGGTGA AATCATGCCG AACATCCGC AGATGTCCGC TTTCTGGTAT
 GCCGTGCGTA CTGCGGTGAT CAACGCCGCC AGCGGTGTC AGACTGTGCA TGAAGCCCTG
 AAAGACGCGC AGACTAATTG GAGCTCGAAC AACAACAACA ATAACAATAA CAACAACCTC
 GGGATCGAGG GAAGGATTTC AGAATTGCGC GCGCTATGA ATATCATACA AGGAAATTAA
 GTTGGTACAG GTCTTAAAT CGGAATCGTA GTAGGAAGAT TTAATGATTT TATTACGAGC
 AAGCTGCTGA GCGGAGCAGA AGATGCGCTG CTCAGACATG GCGTAGACAC AATGACATT
 GATGTGGCTT GGGTTCCAGG CGCATTGAA ATACCGTTTG CTGCGAAAAA AATGGCGGAA
 ACAAAAAAT ATGATGCTAT TATCACATTG GGCACTGTCA TCAGAGGCAG AACGACACAT
 TACGATTATG TCTGCAATGA AGCTGCAAAA GGCATCGCGC AAGCAGCAAA CACTACTGGT
 GTACCTGTCA TCTTGGAAAT TGTAACAATC GAAAACATCG AACAGGCTAT CGAGCGTGCC
 GGCACAAAAG CGGGCAACAA AGGTGTAGAT TGTGCTGTTT CTGCCATTGA AATGGCAAAT
 TTAAACCGCT CATTGAAATA ATTTGGATCC STCGACCTGC AGCCAAGCTT AATTAGCTGA
 GCTTGGACTC CTGTTGATAG ATCCAGTAAT GACCTCAGAA CTCCCATCTGG ATTTGTTCA
 AACGCTCGGT TGCCGCCGG CGTTTTTAT TGGTGAGAAT CCAAGCTAGC TTGGCGAGAT
 TTTCAGGAGC TAAGGAAGCT AAAATGGAGA AAAAATCAC TGGATATACCC ACCGTTGATA
 TATCCCAATG GCATCGTAAA GAACATTTG AGGCATTCA GTCAGTTGCT CAATGTACCT
 ATAACCAGAC CGTCAGCTG GATATTACGG CCTTTTAAA GACCGTAAAG AAAATAAGC
 ACAAGTTTA TCCGGCCTT ATTACACATTC TTGCCCGCCT GATGAATGCT CATCCGGAAT
 TTCGTATGGC AATGAAAGAC GGTGAGCTGG TGATATGGGA TAGTGTTCAC CCTTGTAC
 CCGTTTCCA TGAGCAACT GAAACGTTT CATCGCTCTG GAGTGAATAC CACGACGATT

TCCGGCAGTT TCTACACATA TATTGCCAAG ATGTGGCGTG TTACGGTGA AACCTGGCCT
 ATTTCCCTAA AGGGTTTATT GAGAATATGT TTTTCGTCTC AGCCAATCCC TGGGTGAGTT
 TCACCACTTT TGATTTAAC GTGCCAATA TGGACAACCTT CTTCGCCCCC GTTTCACCA
 TGCATGGCA AATATTATAAC GCAAGGCGAC AAGGTGCTGA TGCGCGTGGC GATTCAAGGTT
 CATCATGCCG TCTGTGATGG CTTCCATGTC GGCAGAAATGC TTAATGAATT ACAACAGTAC
 TGCGATGAGT GGCAGGGCGG GGCGTAATT TTTTAAGGCA GTTATTGGTG CCCTTAAACG
 CCTGGGTAA TGACTCTCTA CCTTGAGGCA TCAAATAAAA CGAAAGGCTC AGTCGAAAGA
 CTGGGCCTTT CGTTTATCT GTTGTGTC GGTGAACGCT CTCCTGAGTA GGACAAATCC
 GCCGCTCTAG AGCTGCCTCG CGCGTTTCGG TGATGACGGT GAAAACCTCT GACACATGCA
 GCTCCCGAG ACGGTACAG CTTGTCTGTA AGCGGATGCC GGGAGCAGAC AAGCCCGTCA
 GGGCGCGTCA GCGGGTGTG GCGGGTGTG GGGCGCAGCC ATGACCCAGT CACGTAGCGA
 TAGCGGAGTG TATACTGGCT TAACTATGCG GCATCAGAGC AGATTGTACT GAGAGTGCAC
 CATATGCGGT GTGAAATACC GCACAGATGC GTAAGGAGAA AATACCGCAT CAGGGCCTCT
 TCCGCTTCCT CGCTCACTGA CTCGCTGCC TCGGTCTGTC GGCTGCCGGC AGCGGTATCA
 GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG GGGATAACGC AGGAAAGAAC
 ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA AGGCCCGTT GCTGGCGTTT
 TTCCATAGGC TCCGCCCTCC TGACGAGCAT CACAAAAATC GACGCTCAAG TCAGAGGTGG
 CGAAACCGA CAGGACTATA AAGATACCAAG GCGTTCCCC CTGGAAGCTC CCTCGTGC
 TCTCCTGTT CGACCCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG CCTTCTCCC TTCGGGAAGC
 GTGGCGCTTT CTCATGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT CGGTGTAGGT CGTTCGCTCC
 AAGCTGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCGACC GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC
 TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC GACTTATCGC CACTGGCAGC AGCCACTGGT
 AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG AGTTCTGAA GTGGTGGCCT
 AACTACGGCT ACACTAGAAG GACAGTATT CCGTATCTGCG CTCTGCTGAA GCCAGTTACC
 TTCGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAAACAAA CCACCGCTGG TAGCGGTGGT
 TTTTTGTTT GCAAGCAGCA GATTACGCC AGAAAAAAAG GATCTAAGA AGATCCTTG
 ATCTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAAAGT CACGTTAAGG GATTTGGTC
 ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTCACCTAG ATCCTTTAA ATTAAAAATG AAGTTTAAA
 TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT ACCAATGCTT AATCAGTGAG
 GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTCGT TCATCCATAG CTGCCTGACT CCCCCGTG
 TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA GTGCTGCAAT GATACCGCGA
 GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA GCAATAAACC AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG
 CGCAGAAGTG GTCCCTGCAAC TTTATCCGCC TCCATCCAGT CTATTAATTG TTGCCGGGAA
 GCTAGAGTAA GTAGTTGCC AGTTAATAGT TTGCGCAACG TTGTTGCCAT TGCTACAGGC
 ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATTC GCTCCGGTTC CCAACGATCA
 AGGCAGGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCCGG TTAGCTCCTT CGGTCCCTCG
 ATCGTTGTC GAAAGTAAGTT GGCCGCAGTG TTATCACTCA TGGTTATGGC AGCACTGCAT
 AATTCTCTTA CTGTCATGCC ATCCGTAAGA TGCTTTCTG TGACTGGTGA GTACTCAACC
 AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCCCGGA CGGAGTTGCT CTTGCCCGGC GTCAATACGG
 GATAATAACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAGTGCTCA TCATTGGAA ACGTTCTCG
 GGGCGAAGAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA GTTCGATGTA ACCCACTCGT
 GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTACT TTCACCAAGCG TTTCTGGGTG AGCAAAAACA

GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGATA AGGGCGACAC GGAAATGTTG AATACTCATA
 CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT ATTGTCTCAT GAGCAGGATAC
 ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAACAA ATAGGGGTTC CGCGCACATT TCCCCGAAAA
 GTGCCACCTG ACGTCTAAGA AACCATTATT ATCATGACAT TAACCTATAA AAATAGGCGT
 ATCACGGAGGC CCTTTCGTCT TCAC//

SEQ ID No.12: pNCO-BS-LuSy-EC-DHFR

pNCO-C-BS-LuSy mit Gen für die Dihydrofolatreduktase aus Escherichia coli.

SEQUENCE 4380 BP; 1161 A; 1022 C; 1086 G; 1111 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAT CATAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGAAT
 ATCATACAAAG GAAATTTAGT TGGTACAGGT CTTAAAATCG GAATCGTAGT AGGAAGATT
 AATGATTTA TTACGAGCAA GCTGCTGAGC GGAGCAGAAG ATGCGCTGCT CAGACATGGC
 GTAGACACAA ATGACATTGA TGTGGCTTGG GTTCCAGGCG CATTGAAAT ACCGTTTGCT
 GCGAAAAAAA TGGCGGAAAC AAAAATAT GATGCTATTA TCACATTGGG CACTGTCATC
 AGAGGCGCAA CGACACATTA CGATTATGTC TGCAATGAAG CTGCAAAAGG CATCGCGCAA
 GCAGCAAACA CTACTGGTGT ACCTGTCATC TTTGAAATTG TAACAATGAA AAACATCGAA
 CAGGCTATCG AGCGTGCAGG CACAAAAGCG GGCAACAAAG GTGTAGATTG TGCTTTCT
 GCCATTGAAA TGGCAAATTAAACCGCTCA TTTGAATTAG CGGCCGCTGG TGGAGGCGGA
 ATGATCAGTC TGATTGCGGC GTTACGGTA GATCGCTTA TCGGCATGGA AAACGCCATG
 CCGTGGAAACC TGCCTGCCGA TCTCCCTGG TTTAAACGCA ACACCTTAAA TAAACCCGTG
 ATTATGGGCC GCCATACCTG GGAATCAATC GGTCGTCCGT TGCCAGGACG CAAAAATATT
 ATCCTCAGCA GTCAACCGGG TACGGACGAT CGCGTAACGT GGGTGAAGTC GGTGGATGAA
 GCCATCGCGG CGTGTGGTGA CGTACAGAA ATCATGGTGA TTGGCGCGG TCGCGTTAT
 GAACAGTTCT TGCCAAAAGC GCAAAACTG TATCTGACGC ATATCGACGC AGAAGTGGAA
 GGCGACACCC ATTTCCCGGA TTACGAGCCG GATGACTGGG AATCGGTATT CAGCGAATT
 CACGATGCTG ATGCGCAGAA CTCTCACAGC TATTGCTTGG AGATTCTGGA GCGGCGGTAA
 GGATCCGTG ACCTGCGAGCC AAGCTTATT AGCTGAGCTT GGACTCCTGT TGATAGATCC
 AGTAATGACC TCAGAACTCC ATCTGGATT TTTCAAGACG CTCGGTTGCC GCGGGCGTT
 TTTTATTGGT GAGAATCCAA GCTAGCTTGG CGAGATTTC AGGAGCTAAG GAAGCTAAAA
 TGGAGAAAAA AATCACTGGA TATACCAACCG TTGATATATC CCAATGGCAT CGTAAAGAAC
 ATTTGAGGC ATTCAGTC GTTGCTCAAT GTACCTATAA CCAGACCGTT CAGCTGGATA
 TTACGGCCTT TTTAAAGACC GAAAGACAAA ATAAAGCACAA GTTTTATCCG GCCTTATT
 ACATTCTTC CCGCCTGATG AATGCTCATC CGGAATTTCG TATGGCAATG AAAGACGGTG
 AGCTGGTGAT ATGGGATAGT GTTCACCCCTT GTTACACCGT TTTCCATGAG CAAACTGAAA
 CGTTTCATC GCTCTGGAGT GAATACACAGC AGGATTTCCG GCAGTTTCTA CACATATATT
 CGCAAGATGT GGCCTGTTAC GGTGAAAACC TGGCCTATT CCCTAAAGGG TTTATTGAGA

ATATGTTTT CGTCTCAGCC AATCCCTGGG TGAGTTTCAC CAGTTTGAT TTAAACGTGG
 CCAATATGGA CAACTTCTTC GCCCCCCTTT TCACCATGCA TGGGCAAATA TTATACGCAA
 GGCGACAAGG TGCTGATGCC GCTGGCGATT CAGGTTCATC ATGCCGTCTG TGATGGCTTC
 CATGTCGGCA GAATGCTTAA TGAATTACAA CAGTACTGCG ATGAGTGGCA GGGCGGGCG
 TAATTTTTT AAGGCAGTTA TTGGTGCCTT TAAACGCCTG GGGTAATGAC TCTCTAGCTT
 GAGGCATCAA ATAAAACGAA AGGCTCAGTC GAAAGACTGG GCCTTCGTT TTATCTGTTG
 TTTGTCGGTG AACGCTCTCC TGAGTAGGAC AAATCCGCCG CTCTAGAGCT GCCTCGCGCG
 TTTCGGTGAT GACGGTGAAA ACCTCTGACA CATGCAGCTC CCGGAGACGG TCACAGCTTG
 TCTGTAAGCG GATGCCGGGA GCAGACAAGC CCGTCAGGGC GCGTCAGCGG GTGTTGGCGG
 GTGTCGGGGC GCAGCCATGA CCCAGTCACG TAGCGATAGC GGAGTGTATA CTGGCTTAAC
 TATGCGGCAT CAGAGCAGAT TGTACTGAGA GTGCACCATA TGGGTGTGA AATACCGCAC
 AGATGCGTAA GGAGAAAATA CCGCATCAGG CGCTCTTCCG CTTCTCGCT CACTGACTCG
 CTGCGCTCGG TCTGTCGGCT GCGGCGAGCG GTATCAGCTC ACTCAAAGGC GGTAATACGG
 TTATCCACAG AATCAGGGGA TAACGCAGGA AAGAACATGT GAGCAAAAGG CCAGCAAAAG
 GCCAGGAACC STAAAAAGGC CGCGTTGCTG GCGTTTTCC ATAGGCTCCG CCCCCCTGAC
 GAGCATTACA AAAATCGACG CTCAAGTCAG AGGTGGCGAA ACCCGACAGG ACTATAAAAGA
 TACCAGGCGT TTCCCCCTGG AAGCTCCCTC GTGCGCTCTC CTGTTCCGAC CCTGCCGCTT
 ACCGGATACC TGTCCGCCTT TCTCCCTCG GGAAGCGTGG CGCTTCTCA ATGCTCACGC
 TGTAGGTATC TCAGTTCGGT GTAGGTGTT CGCTCCAAGC TGGGTGTGT GCACGAACCC
 CCCGTTCAAGC CCGACCGCTG CGCCTTATCC GGTAACTATC GTCTTGAGTC CAACCCGGTA
 AGACACGACT TATGCCACT GGCAGCAGCC ACTGGTAACA GGATTAGCAG AGCGAGGTAT
 GTAGGGGGT CTACAGAGTT CTTGAAGTGG TGGCCTAACT ACGGCTACAC TAGAAGGACA
 GTATTTGGTA TCTGCGCTCT GCTGAAGCCA GTTACCTTCG GAAAAAGAGT TGGTAGCTCT
 TGATCCGGCA AACAAACCAC CGCTGGTAGC GGTGGTTTT TTGTTTGCAA GCAGCAGATT
 ACGCGCAGAA AAAAGGATC TCAAGAAGAT CTTTGATCT TTTCTACGGG GTCTGACGCT
 CAGTGGAACG AAAACTCACG TTAAGGGATT TTGGTCATGA GATTATCAAA AAGGATCTTC
 ACCTAGATCC TTTAAATTAA AAAATGAAGT TTTAAATCAA TCTAAAGTAT ATATGAGTAA
 ACTTGGTCTG ACAGTTACCA ATGCTTAATC AGTGAGGCAC CTATCTCAGC GATCTGTCTA
 TTTCGTTCAT CCATAGCTGC CTGACTCCCC GTCGTGAGA TAACTACGAT ACGGGAGGGC
 TTACCATCTG GCCCCAGTGC TGCAATGATA CCGCGAGACC CACGCTCACC GGCTCCAGAT
 TTATCAGCAA TAAACCAGCC AGCCGGAAGG GCGAGCGCA GAAGTGGTCC TGCAACTTTA
 TCCGCCTCCA TCCAGTCTAT TAATTGTTGC CGGGAAGCTA GAGTAAGTAG TTGCGCAGTT
 AATAGTTGC GCAACGTTGT TGCCATTGCT ACAGGCATCG TGGTGTCAAG CTCGTCGTTT
 GGTATGGCTT CATTTCAGCTC CGGTTCCCAA CGATCAAGGC GAGTTACATG ATCCCCCATG
 TTGTGCAAAA AAGCGGTTAG CTCCTTCGGT CCTCCGATCG TTGTCAGAAG TAAGTTGGCC
 GCAGTGTAT CACTCATGGT TATGGCAGCA CTGCATAATT CTCTTACTGT CATGCCATCC
 GTAAGATGCT TTTCTGTGAC TGGTGAGTAC TCAACGAAGT CATTCTGAGA ATAGTGTATG
 CGGCGACCGA GTTGCTCTG CCCGGCGTCA ATACGGGATA ATACCCGCC ACATAGCAGA
 ACTTTAAAAG TGCTCATCAT TGGAAAACGT TCTTCGGGGC GAAAACCTCTC AAGGATCTTA
 CCGCTGTTGA GATCCAGTTC GATGTAACCC ACTCGTGCAC CCAACTGATC TTCAGCATCT
 TTTACTTTCA CCAGCGTTTC TGGGTGAGCA AAAACAGGAA GGCAAAATGC CGCAAAAAAG
 GGAATAAGGG CGACACGGAA ATGTTGAATA CTCATACTCT TCCTTTTCA ATATTATTGA

AGCATTTATC AGGGTTATTG TCTCATGAGC GGATACATAT TTGAATGTAT TTAGAAAAAT
 AACAAATAG GGTTCCCGG CACATTCCCG CGAAAAGTGC CACCTGACGT CTAAGAAACC
 ATTATTATCA TGACATTAAC CTATAAAAAT AGGCATATCA CGAGGCCCTT TCGTCTTCAC//

SEQ ID No.13: pNCO-N-VP2-BS-Lusy

Fusion eines Teils des VP2 Oberflächenproteins des 'minc enteritis Virus' an den N-Terminus der Lumazinsynthase aus B. subtilis

SEQUENCE 3936 BP; 1049 A; 914 C; 960 G; 1013 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAT CATAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAG AGGAGAAATT AACTATGGGG
 GACGGTGCTG TTCAGCCGGA CGGTGGTCAG CGGGCTGTTG GTAACGAACG TATGAATATC
 ATACAAGGAA ATTTAGTTGG TACAGGTCTT AAAATCGGAA TCGTAGTAGG AAGATTTAAT
 GATTTATTA CGAGCAAGCT GCTGAGCGGA GCAGAAGATG CGCTGCTCAG ACATGGCGTA
 GACACAAATG ACATTGATGT GGCTTGGGTT CCAGGCGCAT TTGAAATACC GTTGCTGCG
 AAAAAAAATGG CGGAAACAAA AAAATATGAT GCTATTATCA CATTGGGCAC TGTTCATCAGA
 GGCACAAACGA CACATTACGA TTATGTCTGC AATGAAGCTG CAAAAGGCAT CGCGCAAGCA
 GCAAAACACTA CTGGTGTACC TGTTCATCTTT GGAATTGTA CAACGAAAAA CATCGAACAG
 GCTATCGAGC GTGCCGGCAC AAAAGCGGGC AACAAAGGTG TAGATTGTGC TGTTCTGCC
 ATTGAAATGG CAAATTTAAA CCGCTCATTT GAATAAGGAT CCGTCGACCT GCAGCCAAGC
 TTAATTAGCT GAGCTTGGAC TCCTGTTGAT AGATCCAGTA ATGACCTCAG AACTCCATCT
 GGATTGTTG AGAACGCTCG GTGCCGCCG GGCCTTTTT ATTGGTGAGA ATCCAAGCTA
 GCTTGGCGAG ATTTTCAGGA GCTAAGGAAG CTAAAATGGA GAAAAAAATC ACTGGATATA
 CCACCGTTGA TATATCCCAA TGGCATCGTA AAGAACATTT TGAGGCATT CAGTCAGTTG
 CTCAAATGTAC CTATAACCAG ACCGTTCAGC TGGATATTAC GGCCTTTTA AAGACCGTAA
 AGAAAAATAA GCACAAAGTT TATCCGGCCT TTATTACAT TCTTGCCTCG CTGATGAATG
 CTCATCCGGA ATTTCGTATG GCAATGAAAG ACGGTGAGCT GGTGATATGG GATAGTGTTC
 ACCCTGTTA CACCGTTTC CATGAGCAAA CTGAAACGTT TTCATCGCTC TGGAGTGAAT
 ACCACGACGA TTTCCGGCAG TTTCTACACA TATATTGCA AGATGTGGCG TGTTACGGTG
 AAAACCTGGC CTATTCCT AAAGGGTTA TTGAGAATAT GTTTTCGTC TCAGCCAATC
 CCTGGGTGAG TTTCACCAAGT TTTGATTAA ACGTGGCAA TATGGACAAC TTCTCGCCC
 CCGTTTCAC CATGCATGGG CAAATATTAT ACGCAAGGCG ACAAGGTGCT GATGCCGCTG
 GCGATTCAAGG TTCATCATGC CGTCTGTGAT GGCTTCATG TCGGCAGAAT GCTTAATGAA
 TTACAACAGT ACTGCGATGA GTGGCAGGGC GGGCGTAAT TTTTTAAGG CAGTTATTGG
 TGCCCTTAAA CGCCTGGGT AATGACTCTC TAGCTTGAGG CATCAAATAA AACGAAAGGC
 TCAGTCGAAA GACTGGGCCT TTCGTTTTAT CTGTTGTTG TCGGTGAACG CTCTCCTGAG
 TAGGACAAAT CCGCCGCTCT AGAGCTGCCT CGCGCGTTTC GGTGATGACG GTGAAAACCT
 CTGACACATG CAGCTCCCGG AGACGGTCAC AGCTTGTCTG TAAGCGGATG CGGGGAGCAG
 ACAAGCCCGT CAGGGCGCGT CAGCGGGTGT TGGCGGGTGT CGGGGCGCAG CCATGACCCA

GTCAAGTAGC GATAGCGGAG TGTATACTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA
 CTGAGAGTGC ACCATATGCG GTGTGAAATA CGGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC
 ATCAGGCGCT CTTCCGCTTC CTCGCTCACT GACTCGCTGC GCTCGGTCTG TCGGCTGCGG
 CGAGCGGTAT CAGCTCACTC AAAGGCAGTA ATACGGTTAT CCACAGAATC AGGGGATAAC
 GCAGGAAAGA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA GGAACCGTAA AAAGGCCGCG
 TTGCTGGCGT TTTTCCATAG SCTCCGCCCG CCTGACGAGC ATCACAAAAA TCGACGCTCA
 AGTCAGAGGT GGCAGAACCC GACAGGACTA TAAAGATACC AGGCCTTCC CCCTGGAAGC
 TCCCTCGTGC CCTCTCCTGT TCCGACCCCTG CCGCTTACCG GATACTGTC CGCCTTCTC
 CCTTCGGGAA GCGTGGCGCT TTCTCAATGC TCACGCTGTA GGTATCTCAG TTCGGTGTAG
 GTCGTTCGCT CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCCCG TTCAGCCCGA CCGCTGCGCC
 TTATCCGGTA ACTATCGTCT TGAGTCCAAC CGGTAAGAC ACCACTTATC GCCACTGGCA
 GCAGCCACTG GTAACAGGAT TAGCAGAGCG AGGTATGTAG GCGGTGCTAC AGAGTTCTG
 AAGTGGTGGC CTAACTACGG CTACACTAGA AGGACAGTAT TTGGTATCTG CGCTCTGCTG
 AAGCCAGTTA CCTTCGGAAA AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT CCGGCAAACA AACCAACCGCT
 GGTAGCGGTG GTTTTTTGTT TGCAAGCAG CAGATTACGC GCAGAAAAAA AGGATCTCAA
 GAAGATCCTT TGATCTTTTACGGGGTCT GACGCTCAGT GGAACGAAAAA CTCACGTTAA
 GGGATTTGG TCATGAGATT ATCAAAAGG ATCTTCACCT AGATCCTTTT AAATTAACCA
 TGAAGTTTA AATCAATCTA AAGTATATAT GAGTAAACTT GGTCTGACAG TTACCAATGC
 TTAATCAGTG AGGCACCTAT CTCAGCGATC TGTCTATTTC GTTCATCCAT AGCTGCCTGA
 CTCCCCGTCG TGTAGATAAC TACGATAACGG GAGGGCTTAC CATCTGGCCC CAGTGCCTGCA
 ATGATACCGC GAGACCCACG CTCACCGGCT CCAGATTAT CAGCAATAAA CCAGCCAGCC
 GGAAGGGCCCG AGCGCAGAAG TGGTCCTGCA ACTTTATCCG CCTCCATCCA GTCTATTAAT
 TGTTGCCGGG AAGCTAGAGT AAGTAGTTCG CCAGTTAATA GTTGCGCAA CGTTGTTGCC
 ATTGCTACAG GCATCGTGGT GTCACGCTCG TCGTTGGTA TGGCTTCATT CAGCTCCGGT
 TCCCAACGAT CAGGGCGAGT TACATGATCC CCCATGTTGT GCAAAAAAGC GGTTAGCTCC
 TTCGGTCCTC CGATCGTTGT CAGAAGTAAG TTGGCCGCAG TGTTATCACT CATGGTTATG
 GCAGCACTGC ATAATTCTCT TACTGTCTG CCATCCGTAA GATGCTTTTC TGTGACTGGT
 GAGTACTCAA CCAAGTCATT CTGAGAATAG TGTATGCGGC GACCGAGTTG CTCTTGCCCG
 GCGTCAATAC GGGATAATAC CGCGCCACAT AGCAGAACTT TAAAAGTGCT CATCATTGGA
 AACACGTTCTT CGGGGGCGAAA ACTCTCAAGG ATCTTACCGC TGTTGAGATC CAGTTCGATG
 TAACCCACTC GTGCACCCAA CTGATCTTCA GCATCTTTA CTTTCACCAG CGTTCTGGG
 TGAGCAAAAA CAGGAAGGCA AAATGCCGCA AAAAAGGGAA TAAGGGCGAC ACGGAAATGT
 TGAATACTCA TACTCTTCCT TTTCAATAT TATTGAAGCA TTTATCAGGG TTATTGTCTC
 ATGAGCGGAT ACATATTGAA ATGTATTTAG AAAAATAAAC AAATAGGGGT TCCGCGCACA
 TTTCCCCGAA AAGTGCCACC TGACGTCTAA GAAACCATTA TTATCATGAC ATTAACCTAT
 AAAAATAGGC GATTCACGAG GCCCTTCTGT CTTCAC//"

SEQ ID No.14: pNCO-C-VP2-BS-Lusy

Fusion eines Teils des VP2 Oberflächenproteins des 'minc enteritis Virus' an den C-Terminus der Lumazinsynthase aus B. subtilis

SEQUENCE 3932 BP; 1046 A; 915 C; 958 G; 1013 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAT CATAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAG AGGAGAAATT AACTATGAAT
ATCATACAAG GAAATTTAGT TGGTACAGGT CTTAAAATCG GAATCGTAGT AGGAAGAGATT
AATGATTTA TTACGAGCAA GCTGCTGAGC GGAGCAGAAG ATGCCTGCT CAGACATGGC
GTAGACACAA ATGACATTGA TGTGGCTTGG GTTCCAGGGCG CATTGAAAT ACCGTTGCT
GCGAAAAAAA TGGCGGAAAC AAAAAAATAT GATGCTATTA TCACATTGGG CACTGTCATC
AGAGGCGCAA CGACACATTA CGATTATGTC TGCAATGAAG CTGCAAAAGG CATCGCGAA
GCAGCAAACA CTACTGGTGT ACCTGTCATC TTTGGAATTG TAACAATGAA AAACATCGAA
CAGGCTATCG AGCGTGCCGG CACAAAAGCG GGCAACAAAG GTGTAGATTG TGCTGTTCT
GCCATTGAAA TGGCAAACCTT AAACCGTTCT TTCGAAGGTG ACGGTGCTGT TCAGCCGGAC
GGTGGTCAGC CGGCTGTTCG TAACGAACGT TAGGATCCGT CGACCTGCAG CCAAGCTTAA
TTAGCTGAGC TTGGACTCCT GTTGATAGAT CCAGTAATGAA CCTCAGAACT CCATCTGGAT
TTGTTCAGAA CGCTCGGTTG CCGCCGGCG TTTTTATTG GTGAGAATCC AAGCTAGCTT
GGCGAGATTT TCAGGAGCTA AGGAAGCTAA AATGGAGAAA AAAATCACTG GATATACCAC
CGTTGATATA TCCCAATGGC ATCGTAAAGA ACATTTGAG GCATTTCACT CAGTTGCTCA
ATGTACCTAT AACCAAGACCG TTCAGCTGGA TATTACGGCC TTTTAAAGA CCGTAAAGAA
AAATAAGCAC AAGTTTATC CGGCCCTTAT TCACATTCTT GCCCGCCTGA TGAATGCTCA
TCCGGAATTT CGTATGGCAA TGAAAGACGG TGAGCTGGT ATATGGGATA GTGTTCACCC
TTGTTACACC GTTTCCATG AGCAAACGT AACGTTTCA TCGCTCTGGA GTGAATACCA
CGACGATTT CGGCAGTTTC TACACATATA TTCGCAAGAT GTGGCGTGT ACAGGTGAAAA
CCTGGCCTAT TTCCCTAAAG GGTTTATTGA GAATATGTT TTCGTCTCAG CCAATCCCTG
GGTGAGTTTC ACCAGTTTG ATTTAAACGT GGCAATATG GACAACCTCT TCGCCCCCGT
TTTCACCATG CATGGGCAA TATTATACGC AAGGGCACAA GGTGCTGATG CCGCTGGCGA
TTCAGGTTCA TCATGCCGTC TGTGATGGCT TCCATGTCGG CAGAATGCTT AATGAATTAC
AACAGTACTG CGATGAGTGG CAGGGCGGG CGTAATTGGT TTAAGGCAGT TATTGGTGC
CTTAAACGCC TGGGGTAATG ACTCTCTAGC TTGAGGCATC AAATAAAACG AAAGGCTCAG
TCGAAAGACT GGGCCTTCG TTTTATCTGT TGTTGTCGG TGAACGCTCT CCTGAGTAGG
ACAAATCCGC CGCTCTAGAG CTGCCCTCGC CGTTTCGGT ATGACGGTGA AAACCTCTGA
CACATGCAGC TCCCGGAGAC GGTACAGCT TGTCTGTAAG CGGATGCCGG GAGCAGACAA
GCCCGTCAGC GCGCGTCAGC GGGTGTGGC GGGTGTGGG GCGCAGCCAT GACCCAGTC
CGTAGCGATA GCGGAGTGT AACTGGCTTA ACTATGCCG ATCAGAGCAG ATTGTACTGA
GAGTGCACCA TATGCGGTGT GAAATACCGC ACAGATGCGT AAGGAGAAAA TACCGCATCA
GGCGCTCTTC CGCTTCCCTCG CTCACTGACT CGCTGCGCTC GGTCTGTCGG CTGCGCGAG
CGGTATCAGC TCACTCAAAG GCGGTAAATAC GGTTATCCAC AGAATCAGGG GATAACGCAG
GAAAGAACAT GTGAGCAAAA GGCCAGCAA AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG GCCGCGTTGC
TGGCGTTTT CCATAGGCTC CGCCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAAATCGA CGCTCAAGTC
AGAGGTGGCG AAACCCGACA GGACTATAAA GATACCAGGC GTTCCCCCT GGAAGCTCCC
TCGTGCGCTC TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC TTACCGGATA CCTGTCGCC TTTCTCCCTT

CGGGAAACCGT GGCCTTTCT CAATGCTCAC GCTGTAGGTA TCTCAGTTCG GTGTAGGTCG
 TTCGCTCCAA GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCGTTCA GCCCCGACCGC TGCACCTTAT
 CCGGTAACTA TCGTCTTGAG TCCAACCCGG TAAAGACACGA CTTATGCCA CTGGCAGCAG
 CCACTGGTAA CAGGATTAGC AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG TGCTACAGAG TTCTTGAAGT
 GGTGGCCTAA CTACGGCTAC ACTAGAAGGA CAGTATTGAG TATCTGCGCT CTGCTGAAGC
 CAGTTACCTT CGGAAAAAGA GTTGGTGGCT CTTGATCCGG CAAACAAACC ACGCTGGTA
 GCGGTGGTTT TTTTGTTCG AAGCAGCAGA TTACGCGCAG AAAAAAAGGA TCTCAAGAAG
 ATCCTTGAT CTTTCTACG GGGTCTGACG CTCAGTGGAA CGAAAATCA CGTTAAGGGA
 TTTTGGTCAT GAGATTATCA AAAAGGATCT TCACCTAGAT CCTTTAAAT TAAAATGAA
 GTTTTAAATC AATCTAAAGT ATATATGAGT AAACCTGGTC TGACAGTTAC CAATGCTTAA
 TCAGTGAGGC ACCTATCTCA GCGATCTGTC TATTCGTTTC ATCCATAGCT GCCTGACTCC
 CCGTCGTGTA GATAACTACG ATACGGGAGG GCTTACCATC TGGCCCCAGT GCTGCAATGA
 TACCGCGAGA CCCACGCTCA CCGGCTCCAG ATTTATCAGC AATAAACCAG CCAGCCGGAA
 GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT CCTGCAACTT TATCCGCTC CATCCAGTCT ATTAATTGTT
 GCGGGGAAGC TAGAGTAAGT AGTCGCCAG TTAATAGTTT GCGCAACGTT GTTGCCATTG
 CTACAGGCAT CGTGGTGTCA CGCTCGTGT TTGGTATGGC TTCATTCAAGC TCCGGTTCCC
 AACGATCAAG GCGAGTTACA TGATCCCCA TGTTGTGCAA AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG
 GTCCTCCGAT CGTTGTCAGA AGTAAGTTGG CCGCAGTGTG ATCACTCATG GTTATGGCAG
 CACTGCATAA TTCTCTTACT GTCATGCCAT CCGTAAGATG CTTTCTGTG ACTGGTGAGT
 ACTCAACCAA GTCATTCTGA GAATAGTGTG TGCGGCGACC GAGTTGCTCT TGCCCGCGT
 CAATACGGGA TAATACCGCG CCACATAGCA GAACTTTAA AGTGCTCATC ATTGGAAAAC
 GTTCTCGGG GCGAAAATC TCAAGGATCT TACCGCTGTT GAGATCCAGT TCGATGTAAC
 CCACTCGTGC ACCCAACTGA TCTTCAGCAT CTTTACTTT CACCAGCGTT TCTGGGTGAG
 CAAAAACAGG AAGGCAAAAT GCCGCAAAA AGGGATAAAG GGCGACACGG AAATGTTGAA
 TACTCATACT CTTCTTTTT CAATATTATT GAAGCATTG TCAAGGTTAT TGTCTCATGA
 GCGGATACAT ATTTGAATGT ATTTAGAATAA ATAAACAAAT AGGGGTTCCG CGCACATTTC
 CCCGAAAAGT GCCACCTGAC GTCTAAGAAA CCATTATTAT CATGACATTAA ACCTATAAAA
 ATAGGCGTAT CACGAGGCC TTTCGTCTTC AC//

SEQ ID No.15: pNCO-N/C-VP2-BS-Lusy

Fusion eines Teils des VP2 Oberflächenproteins des 'minc enteritis Virus' an den N- und an den C-Terminus der Lumazinsynthase aus B. subtilis

SEQUENCE 3989 BP; 1055 A; 928 C; 981 G; 1025 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAAT CATAAAAAT TTATTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAG AGGAGAAATT AACTATGGGG
 GACGGTGCTG TTCAGCCGGA CGGTGGTCAG CCGGCTGTTG TAAACGAACG TATGAATATC
 ATACAAGGAA ATTTAGTTGG TACAGGTCTT AATACGGAA TCGTAGTAGG AAGATTAAAT
 GATTTATTA CGAGCAAGCT GCTGAGCGGA GCAGAAGATG CGCTGCTCAG ACATGGCGTA

GACACAAATG AGATTGATGT GGCTTGGTT CCAGGCGCAT TTGAAATACC GTTGCTGCG
 AAAAAATGG CGGAAACAAA AAAATATGAT GCTATTATCA CATTGGGCAC TGTCATCAGA
 GGCGAACGA CACATTACGA TTATGTCTGC AATGAAGCTG CAAAAGGCAT CGCGCAAGCA
 GCAACACTA CTGGTGTACC TGTCACTTT GGAATTGTA CAACTGAAAA CATCGAACAG
 GCTATCGAGC GTGCCGGCAC AAAAGCGGGC AACAAAGGTG TAGATTGTGC TGTTCTGCC
 ATTGAAATGG CAAACTTAAA CGTTCTTC GAAGGGTACG GTGCTGTTCA GCCGGACGGT
 GGTCAGCCGG CTGTTCGTA CGAACGTTAG GATCCGTGCA CCTGCAGCCA AGCTTAATTA
 GCTGAGCTTG GACTCCTGTT GATAGATCCA GTAATGACCT CAGAACTCCA TCTGGATTTG
 TTCAGAACGC TCGGTTGCCG CCGGCGTTT TTTATTGGT AGAATCCAAG CTAGCTTGGC
 GAGATTTCA GGAGCTAAGG AAGCTAATAT GGAGAAAAAA ATCACTGGAT ATACCACCGT
 TGATATATCC CAATGGCATC GTAAAGAACCA TTTGAGGCA TTTCAGTCAG TTGCTCAATG
 TACCTATAAC CAGACCGTTC AGCTGGATAT TACGGCCTTT TAAAGACCG TAAAGAAAAA
 TAAGCACAAG TTTTATCCGG CCTTTATTCA CATTCTGCC CGCCTGATGA ATGCTCATCC
 GGAATTCGT ATGGCAATGA AAGACGGTGA GCTGGTATA TGGGATAGTG TTCACCCCTG
 TTACACCGTT TTCCATGAGC AAACGAAAC GTTTCATCG CTCTGGAGTG AATACCACGA
 CGATTCCGG CAGTTCTAC ACATATATTC GCAAGATGTG GCGTGTACG GTGAAAACCT
 GGCCTATTTC CCTAAAGGGT TTATTGAGAA TATGTTTTCA GTCTCAGCCA ATCCCTGGGT
 GAGTTTCACC AGTTTGATT TAAACGTGGC CAATATGGAC AACTTCTCG CCCCCGTTT
 CACCATGCAT GGGCAAATAT TATACGCAAG GCGACAAGGT GCTGATGCCG CTGGCGATTC
 AGGTTCATCA TGCGTCTGT GATGGCTTCC ATGTCGGCAG AATGCTTAAT GAATTACAAC
 AGTACTGCGA TGAGTGGCAG GGCGGGCGT AATTTTTTA AGGCAGTTAT TGGTGCCTT
 AAACGCCCTGG GGTAAATGACT CTCTAGCTTG AGGCATCAAA TAAAACGAAA GGCTCAGTCG
 AAAGACTGGG CCTTCGTT TATCTGTTGT TTGTCGGTGA ACCTCTCCT GAGTAGGACA
 AATCCGCCGC TCTAGAGCTG CCTCGCGCGT TTCGGTGATG ACGGTGAAAA CCTCTGACAC
 ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTGT CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG CAGACAAGCC
 CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG TGTTGGCGGG TGTCGGCG CAGCCATGAC CCAGTCACGT
 AGCGATAGCG GAGTGTATAC TGGCTTAACT ATGCGGATC AGAGCAGATT GTACTGAGAG
 TGCACCATAT CGGGTGTGAA ATACCGACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC CGCATCAGGC
 GCTCTCCGC TTCCCTGCTC ACTGACTCGC TGCGCTCGGT CTGTCGGCTG CGGCGAGCGG
 TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA
 AGAACATGTG AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAGGCC GCGTTGCTGG
 CGTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACCC TCAAGTCAGA
 GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAGAT ACCAGGCCTT TCCCCCTGGA AGCTCCCTCG
 TGCGCTCTCC TGTTCCGACC CTGCCGCTTA CCGGATAACCT GTCCGCTTT CTCCCTCGG
 GAAGCGTGGC GCTTCTCAA TGCTCAGCCT GTAGGTATCT CAGTTGGTG TAGTCGTTG
 GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC GCCTTATCCG
 GTAATATCG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATGCCACTG GCAGCAGCCA
 CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC TTGAAGTGGT
 GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG
 TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAAACCACC GCTGGTAGCG
 GTGGTTTTT TGTTTGCAAG CAGCAGATT CCGCGAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC
 CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AACTCACGT TAAGGGATTT

TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATTAA AAATGAAGTT
 TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGASTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA TGCTTAATCA-
 GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTCATC CATAGCTGCC TGACTCCCCG
 TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT GCAATGATAC
 CGCGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAAGCCA GCCGGAAAGGG
 CCGAGCCGAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT AATTGTTGCC
 GGGAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTGCG CAACGTTGTT GCCATTGCTA
 CAGGCATCGT GGTGTCACCGC TCGTCGTTG GTATGGCTTC ATTCAAGCTCC GGTTCCCAAC
 GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCCATGT TGTGCAAAAA ACCGGTTAGC TCCTTCGGTC
 CTCCGATCGT TGTCAGAAGT AAGTGGCCG CAGTGTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC
 TGCATAATT CTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT GGTGAGTACT
 CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCGACCGAG TTGCTCTTGC CCGGGGTCAA
 TACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT
 CTTCGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG ATGTAACCCA
 CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTCAC CAGCGTTCT GGGTGAGCAA
 AACACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA TGTTGAATAC
 TCATACTCTT CCTTTTCAA TATTATTGAA GCATTATCA GGGTTATTGT CTCATGAGCG
 GATACATATT TGAATGTATT TAGAAATA AACAAATAGG CGTTCCGCGC ACATTCCCC
 GAAAAGTGCC ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC TATAAAAATA
 GGCGTATCAC GAGGCCCTT CGTCTTCAC//

SEQ ID No 16: pNCO-C-Biotag-BS-Lusy

Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* mit biotinylierfähigem Peptid am C-Terminus

SEQUENCE 3927 BP; 1048 A; 915 C; 955 G; 1009 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAT CATAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAG AGGAGAAATT AACTATGAAT
 ATCATACAAAG GAAATTTAGT TGGTACAGGT CTTAAATCG GAATCGTAGT AGGAAGATTT
 AATGATTTTA TTACGAGCAA GCTGCTGAGC GGAGCAGAAG ATGCGCTGCT CAGACATGGC
 GTAGACACAA ATGACATTGA TGTGGCTTGG GTTCCAGGCG CATTGAAAT ACCGTTTGCT
 GCGAAAAAAA TGGCGGAAAC AAAAATAAT GATGCTATTA TCACATTGGG CACTGTCATC
 AGAGGCGCAA CGACACATTA CGATTATGTC TGCAATGAAG CTGCAAAAGG CATCGCGCAA
 GCAGCAAACA CTACTGGTGT ACCTGTCTC TTTGGAATTG TAACAACTGA AAACATCGAA
 CAGGCTATCG AGCGTGCCTGG CACAAAGCG GGCAACAAAG GTGTAGATTG TGCTTTCT
 GCCATTGAA TGGCAAACCTT AAACCGTTCT TTCAAGCGG CCGCACTCGG CGGCATCTC
 GAAGCTATGA AGATGGAGTG GCGCTAAGGA TCCGTCGACC TGCAAGCCAAG CTTAATTAGC
 TGAGCTTGG A CTCCGTTGA TAGATCCAGT AATGACCTCA GAACCTCCATC TGGATTGTT
 CAGAACGCTC GGTTGCCGCC GGGCGTTTT TATTGGTGAG AATCCAAGCT AGCTTGGCGA

GATTTTCAGG AGCTAAGGAA GCTTAAATGG AGAAAAAAAAT CACTGGATAT ACCACCGTTG
 ATATATCCCA ATGGCATCGT AAAGAACATT TTGAGGCATT TCAGTCAGTT GCTCAATGTA
 CCTATAACCA GACCGTTCAAG CTGGATATTA CGGCCTTTTT AAAGACCGTA AAGAAAAATA
 AGCACAAGTT TTATCCGGCC TTTATTCA CA TTCTGCCCG CCTGATGAAT GCTCATCCGG
 AATTCGTAT GGCAATGAAA GACGGTGAGC TGGTGATATG GGATAGTGTT CACCCCTGTT
 ACACCGTTT CCATGAGCAA ACTGAAACGT TTTCATCGCT CTGGAGTGAA TACCACGACG
 ATTTCCGGCA GTTTCTACAC ATATATTGCG AAGATGTGGC GTGTTACGGT GAAAACCTGG
 CCTATTCCC TAAAGGGTTT ATTGAGAATA TGTTTTCGT CTCAGCCAAT CCCTGGGTGA
 GTTTCACCAAG TTTTGATTAA AACGTGGCCA ATATGGACAA CTTCTTCGCC CCCGTTTCA
 CCATGCATGG GCAAATATTA TACCCAAGGC GACAAGGTGC TGATGCCGCT GGCGATTCA
 GTTCATCATG CCGTCTGTGA TGGCTTCCAT GTCGGCAGAA TGCTTAATGA ATTACAACAG
 TACTGCGATG AGTGGCAGGG CGGGCGTAA TTTTTTAAG GCAGTTATTG GTGCCCTTAA
 ACGCCTGGGG TAATGACTCT CTAGCTTGAG GCATCAAATA AAACGAAAGG CTCAGTCGAA
 AGACTGGGCC TTCGTTTTA TCTGTTGTT GTCGGTGAAC GCTCTCCTGA GTAGGACAAA
 TCCGCCGCTC TAGAGCTGCC TCGCGCGTT CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT
 GCAGCTCCCG GAGACGGTCA CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG
 TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGCGCA GCCATGACCC AGTCACGTAG
 CGATAGCGGA GTGTATACTG GCTTAACTAT GCGGCATCAG AGCAGATTGT ACTGAGAGTG
 CACCATATGC GGTGTGAAAT ACCGCACAGA TGCCTAAGGA GAAAATACCG CATCAGGCC
 TCTTCGCTT CCTCGCTCAC TGACTCGCTG CGCTCGGTCT GTCGGCTGCC GCGAGCGTA
 TCAGCTCACT CAAAGGCGGT AATACGGTTA TCCACAGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAG
 AACATGTGAG CAAAAGGCC GCAAAAGGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG
 TTTTCCATA GGCTCCGCC CCCTGACGAG CATCACAAAA ATCGACGCTC AAGTCAGAGG
 TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGCGTTTC CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG
 CGCTCTCCTG TTCCGACCCCT GCCGCTTACCG GGATACCTGT CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA
 AGCGTGGCGC TTTCTCAATG CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGTGA GGTCGTTCGC
 TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCCC GTTCAGCCCG ACCGCTGCC CTTATCCGGT
 AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCCCGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC AGCAGCCACT
 GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG
 CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT
 ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT
 GGTTTTTTG TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT
 TTGATCTTT CTACGGGTC TGACGCTCAG TGGAACGAAA ACTCACGTTA AGGGATTTG
 GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTT TAAATTAAAA ATGAAGTTTT
 AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT
 GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT CGTTCATCCA TAGCTGCCCTG ACTCCCCGTC
 GTGTAGATAA CTACGATAACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC CCAGTGCTGC AATGATACCG
 CGAGACCCAC GCTCACCGGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC
 GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACCTTATCC GCCTCCATCC AGTCTATTAA TTGTTGCCGG
 GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTGCAGCA ACAGTTGTTGC CATTGCTACA
 GGCATCGTGG TGTCACCGCTC GTCGTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA
 TCAAGGCGAG TTACATGATC CCCCCATGTTG TGCAAAAAAG CGGTTAGCTC CTTCGGTCC

CCGATCGTTG TCGAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT GGCAGCACTG
 CATAATTCTC TTACTGTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT CTGTGACTGG TGAGTACTCA
 ACCAAGTCAT TGTGAGAATA GTGTATGCGG CGACCGAGTT GCTCTGCCCG GCGTCAATA
 CGGGATAATA CGCGCCACA TAGCAGAACT TTAAAAGTGC TCATCATTGG AAAACGTTCT
 TCGGGGCGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT
 CGTGCACCCA ACTGATCTTC ACCATCTTTT ACTTCACCA GCGTTCTGG GTGAGCAAAA
 ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGG ATAAGGGCGA CACGGAAATG TTGAATACTC
 ATACTCTTCC TTTTCAATA TTATTGAGC ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA
 TACATATTTG ATGTATTTA GAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA
 AAAGTGCCAC CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTAAACCTA TAAAATAGG
 CGTATCACGA CCCCTTCG TCTTCAC//

SEQ ID No.17: pNCO-BS-Lusy-Lys165

Lumazinsynthase aus B. subtilis mit Peptid (G4S-G3S-G-Lysin) am C-Terminus
 SEQUENCE 3912 BP; 1042 A; 906 C; 953 G; 1011 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAT CATAAAAT TTATTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGAAT
 ATCATAACAAG GAAATTTAGT TGGTACAGGT CTTAAAATCG GAATCGTAGT AGGAAGATTT
 AATGATTTA TTACGAGCAA GCTGCTGAGC GGAGCAGAAG ATGCGCTGCT CAGACATGGC
 GTAGACACAA ATGACATTGA TGTGGCTTGG GTTCCAGGCG CATTGAAAT ACCGTTGCT
 GCGAAAAAAA TGGCGAACAC AAAAAAATAT GATGCTATTA TCACATTGGG CACTGTCATC
 AGAGGCGCAA CGACACATTA CGATTATGTC TGCAATGAAG CTGAAAAGG CATCGCGCAA
 GCAGCAAACA CTACTGGTGT ACCTGTCATC TTTGGAATTG TAACAACTGA AAACATCGAA
 CAGGCTATCG AGCGTGCCGG CACAAAAGCG GGCAACAAAG GTGTAGATTG TGCTGTTCT
 GCCATTGAAA TGGCAAACCT AAACCGTTCT TTGAAAGGTG GCGGTGGTTC TGGTGGTGGC
 TCTGGTAAAT AAGGATCCGT CGACCTGCAG CCAAGCTAA TTAGCTGAGC TTGGACTCCT
 GTTGATAGAT CCAGTAATGA CCTCAGAACT CCATCTGGAT TTGTTCAGAA CGCTCGGTTG
 CCGCCGGCG TTTTTATTG GTGAGAATCC AAGCTAGCTT GGCGAGATTT TCAGGAGCTA
 AGGAAGCTAA ATGGAGAAA AAAATCACTG GATATACCA CGTTGATATA TCCCAATGGC
 ATCGTAAAGA ACATTTGAG GCATTTCAGT CAGTTGCTCA ATGTACCTAT AACCAAGACCG
 TTCAGCTGGA TATTACGGCC TTTTAAAGA CCGTAAAGAA AAATAAGCAC AAGTTTATC
 CGGCCTTAT TCACATTCTT GCCCGCCTGA TGAATGCTCA TCCGGAATT CGTATGGCAA
 TGAAAGACGG TGAGCTGGTG ATATGGGATA GTGTTACCCC TTGTTACACC GTTTCCATG
 AGCAAACCTGA AACGTTTCA TCGCTCTGGA GTGAATACCA CGACGATTTC CGGCAGTTTC
 TACACATATA TTGCGAAGAT GTGGCGTGT ACGGTGAAAA CCTGGCCTAT TTCCCTAAAG
 GGTTTATTGA GAATATGTTT TTGCTCTCAG CCAATCCCTG GGTGAGTTTC ACCAGTTTG
 ATTTAACGT GGCCAAATATG GACAACCTCT TCGCCCCCGT TTTCACCATG CATGGCAAA
 TATTATACGC AAGGCGACAA GGTGCTGATG CGGCTGGCGA TTCAAGGTTCA TCATGCCGTC
 TGTGATGGCT TCCATGTCGG CAGAATGCTT ATGAATTAC AACAGTACTG CGATGAGTGG

CAGGGCGGGG CGTAATTTT TTAAGGCACT TATTGGTGCC CTTAAACGCC TGGGGTAATG
 ACTCTCTAGC TTGAGGCATC AAATAAAACG AAAGGCTCAG TCGAAAGACT GGGCCTTCG
 TTTTATCTGT TGTGTCGG TGAAACGCTCT CCTGAGTAGG ACAAAATCCGC CGCTCTAGAG
 CTGCCTCGCG CGTTTCGGTG ATGACGGTGA AAACCTCTGA CACATGCAGC TCCCAGGAGAC
 GGTACAGCT TGTCTGTAAG CGGATGCCGG GAGCAGACAA GCCCGTCAGG CGCGTCAGC
 GGGTGTGGC GGGTGTGGGG GCGCAGCCAT GACCCAGTCA CGTAGCGATA CGGGAGTGT
 TACTGGCTTA ACTATGCGGC ATCAGAGCAG ATTGTACTGA GAGTGCACCA TATGCGGTGT
 GAAATACCGC ACAGATGCGT AAGGAGAAAA TACCGCATCA GGCCTCTTC CGCTTCCTCG
 CTCACTGACT CGCTGCGCTC GGTCTGTCGG CTGCGCGAG CGGTATCAGC TCACCAAAG
 GCGGTAATAC GGTTATCCAC AGAACATCAGG GATAACGCAG GAAAGAACAT GTGAGCAAAA
 GGCCAGCAAA AGGCCAGGAA CCGTAAAG GCGCGTTGC TGGCGTTTT CCATAGGCTC
 CGCCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAAATCGA CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG AAACCCGACA
 GGACTATAAA GATACCAGGC GTTCCCCCT GGAAGCTCCC TCGTGCCTC TCCTGTTCCG
 ACCCTGCCGC TTACCGGATA CCTGTCGGCC TTTCTCCCTT CGGGAGCGT GGCGCTTCT
 CAATGCTCAC CCTGTAGGTA TCTCAGTTG GTGTAGGTCG TTGCTCCAA GCTGGGCTGT
 GTGCACGAAC CCCCCGTTCA GCCCGACCGC TCGCCCTTAT CCGGTAACCA TCGTCTTGAG
 TCCAACCCGG TAAGACACGA CTTATGCCA CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGGATTAGC
 AGAGCGAGGT ATGTTAGGCGG TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA CTACGGCTAC
 ACTAGAAGGA CAGTATTTGG TATCTGCGCT CTGCTGAAGC CAGTTACCTT CGGAAAAAGA
 GTTGGTAGCT CTTGATCCGG CAAACAAACC ACCGCTGGTA GCGGTGGTT TTTTGTTC
 AAGCAGCAGA TTACCGCAG AAAAAAAGGA TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT CTTTCTACG
 GGGTCTGACG CTCAGTGGAA CGAAAATCAG CTTAAAGGGAA TTTGGTCAT GAGATTATCA
 AAAAGGATCT TCACCTAGAT CCTTTAAAT TAAAAATGAA GTTAAATC AATCTAAAGT
 ATATATGAGT AAACCTGGTC TGACAGTTAC CAAATGCTTAA TCAGTGAGGC ACCTATCTCA
 GCGATCTGTC TATTCGTTC ATCCATAGCT CCTGACTCC CCGCTGTGA GATAACTACG
 ATACGGGAGG GCTTACCATC TGGCCCGAGT GCTGCAATGA TACCGCGAGA CCCACGCTCA
 CCGGCTCCAG ATTTATCAGC AATAAACAG CCAGCCGGAA GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT
 CCTGCAACTT TATCCGCCTC CATCCAGTCT ATTAATTGTT GCCGGGAAGC TAGAGTAAGT
 AGTTGCCAG TTAATAGTTT GCGCAACGTT GTTGCCTATTG CTACAGGCAT CGTGGTGTCA
 CGCTCGTCGT TTGGTATGGC TTCATTCAAGC TCCGGTCTCC AACGATCAAG GCGAGTTACA
 TGATCCCCCA TGTTGTGCAA AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG GTCCCTCCGAT CGTTGTCA
 AGTAAGTTGG CCGCAGTGTGTT ATCACTCATG GTTATGGCAG CACTGCATAA TTCTCTTACT
 GTCATGCCAT CCTGAAAGATG CTTTCTGTG ACTGGTGAGT ACTCAACCAA GTCATCTGA
 GAATAGTGTGTA TCGGGCGACC GAGTTGCTCT TGCCCGCGT CAATACGGGA TAATACCGCG
 CCACATAGCA GAACTTTAAA AGTGCTCATC ATTGGAAAAC GTTCTTCGGG GCGAAAAC
 TCAAGGATCT TACCGCTGTT GAGATCCAGT TCGATGTAAC CCACTCGTGC ACCCAACTGA
 TCTTCAGCAT CTTTACTTT CACCAGCGTT TCTGGGTGAG CAAAACAGG AAGGCAAAAT
 GCGCAAAA AGGGAAATAAG GGCGACACGG ATATGTTGAA TACTCATACT TTCCCTTTT
 CAATATTATT GAGCATTAA TCAGGGTTAT TGTCTCATGA GCGGATACAT ATTTGAATGT
 ATTTAGAAAA ATAAACAAAT AGGGGTTCCG CGCACATTTC CCCGAAAAGT GCCACCTGAC
 GTCTAAGAAA CCTTATTAT CATGACATTA ACCTATAAAA ATAGGCCTAT CACGAGGCC
 TTTCGTCTTC AC//

SEQ ID No.18: pNCO-BS-Lusy-Cys167

Lumazinsynthase aus B. subtilis mit Peptid (G4S-G3S-G3-CYSTEIN) am C-Terminus
 SEQUENCE 3919 BP; 1039 A; 909 C; 958 G; 1013 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT ATAGATTCA
 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGAAT
 ATCATACAAAG GAAATTAGT TGGTACAGGT CTTAAATATCG GAATCGTGT AGGAAGAGATT
 AATGATTTA TTACGAGCAA GCTGCTGAGC GGAGCAGAAG ATGCGCTGCT CAGACATGGC
 GTAGACACAA ATGACATTGA TGTGGCTTGG GTTCCAGGCG CATTGAAAT ACCGTTGCT
 GCGAAAAAAA TGGCGGAAAC AAAAATAT GATGCTATTA TCACATTGGG CACTGTCATC
 AGAGGCGCAA CGACACATTA CGATTATGTC TGCAATGAAG CTGCAAAAGG CATCGCGCAA
 GCAGCAAACA CTACTGGTGT ACCTGTCATC TTTGAAATTG TAACAACGTAAACATCGAA
 CAGGCTATCG AGCGTGCCGG CACAAAAGCG GGCAACAAAG GTGTAGATTG TGCTTTCT
 GCCATTGAAA TGGCAAACCTT AAACCGTTCT TTCGAAGGTG CGGGTGGTTC TGGTGGTGGC
 TCTGGTGGTG GCTGCTAAGG ATCCGTCGA CCTGCAGCCA AGCTTAATTG GCTGAGCTTG
 GACTCCTGTT GATAGATCCA GTAATGACCT CAGAACTCCA TCTGGATTG TTCAGAACGC
 TCGGTTGCCG CGGGCGTTT TTTATTGGTG AGAATCCAAG CTAGCTTGGC GAGATTTCA
 GGAGCTAAGG AAGCTAAAAT GGAGAAAAAA ATCACTGGAT ATACCACCGT TGATATATCC
 CAATGGCATTG GTAAAGAACAA TTTGAGGCA TTTCACTTCAG TTGCTCAATG TACCTATAAC
 CAGACCGTTC AGCTGGATAT TACGGCCTTT TTAAAGACCG TAAAGAAAAA TAAGCACAAG
 TTTTATCCGG CCTTTATTCA CATTCTTGCC CGCCTGATGA ATGCTCATCC GGAATTCGT
 ATGGCAATGA AAGACGGTGA GCTGGTGATA TGGGATAGTG TTCACCCCTG TTACACCGTT
 TTCCATGAGC AAACTGAAAC GTTTCATCG CTCTGGAGTG AATACCACGA CGATTCCGG
 CAGTTCTAC ACATATATTC GCAAGATGTG GCGTGTACG GTGAAAACCT GGCCTATTC
 CCTAAAGGGT TTATTGAGAA TATGTTTTC GTCTCAGCCA ATCCCTGGGT GAGTTTCACC
 AGTTTGATT TAAACGTGGC CAATATGGAC AACTTCTTCG CCCCCGTTT CACCATGCAT
 GGGCAAATAT TATACGCAAG GCGACAAGGT GCTGATGCCG CTGGCGATTC AGGTCATCA
 TGCGTCTGT GATGGCTTCC ATGTCGGCAG AATGCTTAAT GAATTACAAAC AGTACTGCGA
 TGAGTGGCAG GGCAGGGCGT AATTGGTTA AGGCAGTTAT TGGTGCCTT AAACGCCCTGG
 GGTAAATGACT CTCTAGCTTG AGGCATCAAA TAAACGAAA GGCTCAGTCG AAAGACTGGG
 CCTTTCTTT TATCTGTTGT TTGTCGGTGA ACGCTCTCCT GAGTAGGACA AATCCGCCGC
 TCTAGAGCTG CCTCGCGCGT TTCGGTGATG ACGGTGAAAA CCTCTGACAC ATGCAGCTCC
 CGGAGACGGT CACAGCTTGT CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG CAGACAAGCC CGTCAGGGCG
 CGTCAGCGGG TGTTGGCGGG TGTGGGGCG CAGCCATGAC CCAGTCACGT AGCGATAGCG
 GAGTGTATAC TGGCTTAACG ATGCGGCATC AGAGCAGATT GTACTGAGAG TGCACCATAT
 GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC CGCATCAGGC GCTCTCCGC
 TTCCTCGCTC ACTGACTCGC TGCGCTCGGT CTGTCGGCTG CGGCGAGCGG TATCAGCTCA
 CTCAAAGCG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAAGGGAT AACGCAGGAA AGAACATGTG
 AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAGAGGCC CGGTTGCTGG CGTTTTCCA
 TAGGCTCCGC CCCCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA
 CCCGACAGGA CTATAAAAGAT ACCAGGCCTT TCCCCCTGGA AGCTCCCTCG TCGCCTCTCC
 TGTTCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT GTCCGCCCTT CTCCCTTCGG GAGCGTGGC
 GCTTTCTCAA TGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTGGTG TAGGTGTTG GCTCCAAGCT

GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAAGCC CGACCGCTGC GCCTTATCCG STAACTATCG
 TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG GCAGCAGCCA CTGGTAACAG
 GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCAGGTGC TACAGAGTTC TTGAAGTGGT GGCCTAACTA
 CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTCGG
 AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAAACCACC GCTGGTAGCG GTGGTTTTT
 TGTGCAAG CAGCAGATTAA CGCGCAGAAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT
 TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AAACTCACGT TAAGGGATTT TGGTCATGAG
 ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATTAA AAATGAAGTT TTAAATCAAT
 CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC
 TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCTGTTCATC CATAGCTGCC TGACTCCCCG TCGTGTAGAT
 AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT GCAATGATAC CGCGAGACCC
 ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG
 AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT AATTGTTGCC GGGAAAGCTAG
 AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTGCG CAACGTTGTT GCCATTGCTA CAGGCATCGT
 GGTGTCACGC TCGTCGTTG GTATGGCTTC ATTCAAGCTCC GGTTCCCAAC GATCAAGGCG
 AGTTACATGA TCCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT
 TGTCAAGT AAGTGGCCG CAGTGGTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC TGCATAATT
 TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT GGTGAGTACT CAACCAAGTC
 ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCGACCGAG TTGCTTTGC CCGCGTCAA TACGGATAAA
 TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTAAAAGT GCTCATCATT GGAAACGTT CTTGGGGCG
 AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTG ATGTAACCCA CTCGTGCACC
 CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTCAC CAGCGTTCT GGGTGAGCAA AAACAGGAAG
 GCAAAATGCC GCAAAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA TGGTGAATAC TCATACTCTT
 CCTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT
 TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCCGGCG ACATTTCCCC GAAAAGTGC
 ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC TATAAAAATA GGCATTCAC
 GAGGCCCTTT CGTCTTCAC//

SEQ ID No.19: pFLAG-MAC-BS-Lusy

Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* mit Peptid (MDYKDDDKVKL) am N-Terminus

SEQUENCE 5531 BP; 1346 A; 1411 C; 1449 G; 1325 T; 0 OTHER;

CATCATAACG GTTCTGGCAA ATATTCTGAA ATGAGCTGTT GACAATTAAT CATCGGCTCG
 TATAATGTGT GGAATTGTGA GCGGATAACA ATTTCACACA GGAGATATCT TATGGACTAC
 AAGGACGACG ATGACAAAGT CAAGCTTATG AATATCATAAC AAGGAAATT AGTTGGTACA
 GGTCTTAAAA TCGGAATCGT AGTAGGAAGA TTTATGATT TTATTACGAG CAAGCTGCTG
 AGCGGAGCAG AAGATGCGCT GCTCAGACAT GCGTAGACCA CAAATGACAT TGATGTGGCT
 TGGGTTCCAG GCGCATTGA AATACCGTTT CCTGGAAAAA AAATGGCGGA AACAAAAAA
 TATGATGCTA TTATCACATT GGGCACTGTC ATCAGAGGCG CAACGACACA TTACGATTAT

GTCTGCAATG AAGCTGCAAA AGGCATCGCG CAAGCAGCAA ACACTACTGG TGTACCTGTC
 ATCTTGGAA TTGTAACAAC TGAAACATC GAACAGGCTA TCGAGCGTGC CGGCACAAA
 GCGGGCAACA AAGGTGTTAGA TTGTGCTGTT TCTGCCATTG AAATGCCAAA CTTAAACCGT
 TCTTTCGAAT AAGAATTCCC GGGTACCTGC AGATCTAGAT AGATGAGCTC GTCGAGTGAG
 AGAAGATTT CAGCCTGATA CAGATTAATT CAGAAGCGGT CTGATAAAAC AGAATTGCCC
 TGGCGGCAGT AGCGCGGTGG TCCCPCCCTGA CCCCCATGCCG AACTCAGAAG TGAAACGCCG
 TAGCGCCGAT GGTAGTGTGG GGTCTCCCCA TGCGAGAGTA GGGAACTGCC AGGCATCAA
 TAAAACGAAA CGCTCAGTCG AAAGACTGGG CCTTTCGTTT TATCTGTTGT TTGTCGGTGA
 ACGCTCTCCT GAGTAGGACA AATCCGCCGG GAGCGGATTT GAACGTTGCCG AAGCAACGGC
 CCGGAGGGTG CGGGGCAGGA CGCCGCCAT AAACCTGCCAG GCATCAAATT AAGCAGAAGG
 CCATCCTGAC GGATGGCCTT TTTGCCTTAC TACAAACTCT TTTGTTTATT TTTCTAAATA
 CATTCAAATA TGTATCCGCT CATGAGACAA TAACCCTGAT AAATGCTTCA ATAATATTGA
 AAAAGGAAGA GTATGAGTAT TCAACATTTC CGTGTGCCCT TTATTCCCTT TTTTGCAGCA
 TTTTGCCTTC CTGTTTTGC TCACCCAGAA ACGCTGGTGA AAGTAAAAGA TGCTGAAGAT
 CAGTTGGGTG CACGAGTGGG TTACATCGAA CTGGATCTCA ACAGCGGTAA GATCCTTGAG
 AGTTTCGCC CCGAAGAACG TTTCCAATG ATGAGCACTT TTAAAGTTCT GCTATGTGGC
 GCGGTATTAT CCCGTGTTGA CGCCGGCAA GAGCAACTCG GTCGCCGCAT AACTATTCT
 CAGAATGACT TGGTTGAGTA CTCACCAGTC ACAGAAAAGC ATCTTACGGA TGGCATGACA
 GTAAGAGAAT TATGCAGTGC TGCCATAACC ATGAGTGATA ACACTGCCG CAACTTACTT
 CTGACAACGA TCGGAGGACC GAAGGAGCTA ACCGCTTTT TGACACACAT GGGGGATCAT
 GTAACTCGCC ATGATCGTTG GGAACCGGAG CTGAATGAAG CCATACCAA CGACGAGCGT
 GACACCACGA TGCCTGTAGC AATGGCAACA ACGTTGCCA AACTATTAAC TGGCGAACTA
 CTTACTCTAG CTTCCCGGCA ACAATTAAATA GACTGGATGG AGGCGGATAA AGTTGCAGGA
 CCACTTCTGC GCTCGGCCCT TCCGGCTGGC TGGTTTATTG CTGATAAAATC TGGAGCCGGT
 GAGCGTGGGT CTCGCGGTAT CATTGCAGCA CTGGGGCCAG ATGGTAAGCC CTCCCGTATC
 GTAGTTATCT ACACGACGGG GAGTCAGGCA ACTATGGATG AACGAAATAG ACAGATCGCT
 GAGATAGGTG CCTCACTGAT TAAGCATTGG TAACTGTCAG ACCAAGTTA CTCATATATA
 CTTTAGATTG ATTTAAAATC TCATTTAA TTTAAAAGGA TCTAGGTGAA GATCCTTTT
 GATAATCTCA TGACCAAAAT CCCTTAACGT GAGTTTCGT TCCACTGAGC GTCAGACCCC
 GTAGAAAAGA TCAAAGGATC TTCTTGAGAT CCTTTTTTC TGCGCGTAAT CTGCTGCTTG
 CAAACAAAAA AACCACCGCT ACCAGCGGTG GTTGTGTTGC CGGATCAAGA GCTACCAACT
 CTTTTCCGA AGGTAACTGG CTTCAGCAGA GCGCAGATAAC CAAATACTGT CCTTCTAGTG
 TAGCCGTAGT TAGGCCACCA CTTCAAGAAC TCTGTAGCAC CGCCTACATA CCTCGCTCTG
 CTAATCCTGT TACCAAGTGGC TGCTGCCAGT GGCGATAAGT CGTGTCTTAC CGGGTTGGAC
 TCAAGACGAT AGTTACCGGA TAAGGCGCAG CGGTGGGCT GAACGGGGGG TTCGTGCACA
 CAGCCCAGCT TGGAGCGAAC GACCTACACC GAACTGAGAT ACCTACAGCG TGAGCATTGA
 GAAAGCGCCA CGCTTCCCGA AGGGAGAAAG CGGGACAGGT ATCCGGTAAG CGGCAGGGTC
 GGAACAGGAG AGCGCACGAG GGAGCTTCCA GGGGAAACG CCTGGTATCT TTATAGTCCT
 GTCGGGTTTC GCCACCTCTG ACTTGAGCGT CGATTTTGT GATGCTCGTC AGGGGGCGG
 AGCCTATGGA AAAACGCCAG CAACGCCGCC TTTTACGGT TCCTGGCCTT TTGCTGGCCT
 TTTGCTCACA TGGTCTTCC TGCCTTATCC CCTGATTCTG TGGATAACCG TATTACCGCC
 TTTGAGTGAG CTGATAACCGC TCGCCGCAGC CGAACGACCG AGCGCAGCGA GTCAGTGAGC

GAGGAAGCGG AAAGACCGCCT GATGCGGTAT TTTCTCCTTA CGCATCTGTG CGGTATTTCA
 CACCGCAGAT CCTGACGCGC CCTGTAGCGG CGCATTAAGC CGGGCGGGTG TGGTGGTTAC-
 GCGCAGCGTG ACCGCTACAC TTGCCAGCGC CCTAGCGCCC GCTCCTTCG CTTTCTCCC
 TTCCCTTCTC GCCACGTTCG CCGGCTTCC CCGTCAAGCT CTAAATCGGG GGCTCCCTT
 AGGGTCCGA TTTAGTGCTT TACGGCACCT CGACCCAAA AAACCTGATT AGGGTGATGG
 TTCACGTAGT GGGCCATCGC CCTGATAGAC GGTTTTTCGC CCTTGACGT TGGAGTCCAC
 GTTCTTAAT AGTGGACTCT TGTTCCAAAC TGGAACAACA CTCAACCCTA TCTCGGTCTA
 TTCTTTGAT TTATAAGGG A TTTGCCAT TTCCGGCTAT TGTTAAAAA ATGAGCTGAT
 TTAACAAAAA TTTAACCGGA ATTTAACAA AATATTAACG TTTACAGGAT CTAATGAGGG
 GACGACGACA GTATCGGCCT CAGGAAGATC GCACTCCAGC CAGCTTCCG GCACCGCTTC
 TGGTGCCGG AACCAGGCAA AGCGCCATTC GCCATTCAAG CTGCGCAACT GTTGGGAAGG
 GCGATCGGTG CGGGCCTCT CGCTATTACG CCAGCTGGCG AAAGGGGGAT GTGCTGCAAG
 GCGATTAAGT TGGGTAACGC CAGGGTTTC CCAGTCACGA CGTTGTAAAA CGACGGCCAG
 TGAATCCGTA ATCATGGTCA TAGCTGTTTC CTGTTGAAA TTGTTATCCG CTCACAATTC
 CACACAACAT ACGAGCCGG ACGATAAAGT GTAAAGCCTG GGGTGCCTAA TGAGTGAGCT
 AACTCACATT AATTGCGTT CGCTCACTGC CCGCTTCCA GTGGGAAAC CTGTCGTGCC
 AGCTGCATTA ATGAATCGGC CAACCGCCGG GGAGAGGGCGG TTTGCGTATT GGGGCCAGG
 GTGGTTTTTC TTTTCACCAAG TGAGACGGGC AACAGCTGAT TGCCCTTCAC CGCCTGGCCC
 TGAGAGAGTT GCAGCAAGCG GTCCACGCTG GTTGCCCCA GCAGGCAGAA ATCCTGTTG
 ATGGTGGTTG ACGGGGGAT ATAACATGAG CTGTCCTCGG TATCGTCGTA TCCCACTACC
 GAGATATCCG CACCAACGCG CAGCCGGAC TCGGTAATGG CGCGCATTGC GCCCAGCGCC
 ATCTGATCGT TGGCAACCAG CATCGCAGTG GGAACGATGC CCTCATTCAAG CATTGCAATG
 GTTGTTGAA AACCGGACAT GGCACCTCCAG TCGCCTTCCC GTTCCGCTAT CGGCTGAATT
 TGATTGCGAG TGAGATATTT ATGCCAGCCA GCCAGACGCA GACGCGCCGA GACAGAACTT
 AATGGGCCCG CTAACAGCGC GATTGCTGG TGACCCAATG CGACCAAGATG CTCCACGCC
 AGTCGCGTAC CGTCTTCATG GGAGAAAATA ATACTGTTGA TGGGTGTCTG GTCAGAGACA
 TCAAGAAATA ACGCCGGAAC ATTAGTGCAG GCAGCTTCCA CAGCAATGGC ATCCTGGTCA
 TCCAGCGGAT AGTTAATGAT CAGCCCAGTG ACGCGTGCAG CGAGAAAGATT GTGCACCGCC
 GCTTTACAGG CTTCGACGCC GCTTCGTTCT ACCATCGACA CCACCAAGCT GGCACCCAGT
 TGATCGCGC GAGATTTAAT CGCCGCGACA ATTTGCGACG GCGCGTGCAG GGCCAGACTG
 GAGGTGGCAA CGCCAATCAG CAACGACTGT TTGCCGCCA GTTGTGTGC CACGCGGTTG
 GGAATGTAAT TCAGCTCCGC CATCGCGCT TCCACTTTT CCCCGTTTT CGCAGAAACG
 TGGCTGGCCT GGTCACCAAC GCGGGAAACG GTCTGATAAG AGACACCGGC ATACTCTGCG
 ACATCGTATA ACGTTACTGG TTTCACATT ACCACCCCTGA ATTGACTCTC TTCCGGGCC
 TATCATGCCA TACCGCGAAA GGTTTGCAC CATTCCATGG TGTGAAATTG CTGCAGGTGCG
 AGGGGGTCAT GGCTGCGCCC CGACACCCGC CAACACCCGC TGACCGCCCG TGACGGGCTT
 GTCTGCTCCC GGCATCCGCT TACAGACAAG CTGTGACCGT CTCCGGGAGC TGCATGTGTC
 AGAGGTTTTC ACCGTCACTCA CCGAAACGCG CGAGGCAGCA AGGAGATGGC GCCCAACAGT
 CCCCCGGCCA CGGGCCTGCC ACCATACCCA CGCCGAAACA AGCGCTCATG AGCCCGAAGT
 GCGGAGCCCG ATCTTCCCCA TCGGTGATGT CGCGATATA GGCGCCAGCA ACCGCACCTG
 TGGCGCCGGT GATGCCGGCC ACGATGCGTC CGCGGTAGAG GATCCGGAGC TTATCGACTG
 CACGGTGCAC CAATGCTTCT GGCACGAGCA AGCCATCGGA AGCTGTGGTA TGGCTGTGCA

GGTCGTAAAT CACTGCATAA TTCTGTGCGC TCAAGGCGCA CTCCCGTTCT GGATAATGTT
TTTTGCGCCG A//

SEQ ID No. 20: pNCO-C-His6-BS-Lusy

Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* mit 6x His-Peptid am C-Terminus

SEQUENCE 3897 BP; 1045 A; 911 C; 937 G; 1004 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAG AGGAGAAATT AACTATGAAT
ATCATACAAG GAAATTTAGT TGGTACAGGT CTTAAAATCG GAATCGTAGT AGGAAGATTT
AATGATTTA TTACGAGCAA GCTGCTGAGC GGAGCAGAAG ATGCGCTGCT CAGACATGGC
GTAGACACAA ATGACATTGA TGTGGCTTGG GTTCCAGGCG CATTGAAAT ACCGTTGCT
GCGAAAAAAA TGGCGGAAAC AAAAATAT GATGCTATTAA TCACATTGGG CACTGTCATC
AGAGGCGCAA CGACACATTA CGATTATGTC TGCAATGAAG CTGCAAAGG CATCGCGAA
GCAGCAAACA CTACTGGTGT ACCTGTCATC TTTGGAATTG TAACAACTGA AAACATCGAA
CAGGCTATCG AGCGTGCCGG CACAAAAGCG GGCAACAAAG GTGTAGATTG TGCTGTTCT
GCCATTGAAA TGGCAAACCTT AAACCGTTCT TTCGAACATC ACCATCACCA CCATTAAGGA
TCCGTCGACC TGCAGCCAAG CTTAATTAGC TGAGCTTGGA CTCCTGTTGA TAGATCCAGT
AATGACCTCA GAACTCCATC TGGATTTGTT CAGAACGCTC GGTGCGGCC GGGCGTTTT
TATTGGTGAG AATCCAAGCT AGCTTGGCGA GATTTTCAGG AGCTAAGGAA GCTAAAATGG
AGAAAAAAAT CACTGGATAT ACCACCGTTG ATATATCCC AATGGCATCGT AAAGAACATT
TTGAGGCATT TCAGTCAGTT GCTCAATGTA CCTATAACCA GACCGTTCAG CTGGATATTA
CGGCCTTTT AAAGACCGTA AAGAAAAATA AGCACAAAGTT TTATCCGGCC TTTATTCA
TTCTTGCCCG CCTGATGAAT GCTCATCCGG AATTCGTAT GGCAATGAAA GACGGTGAGC
TGGTGATATG GGATAGTGTT CACCCCTGTT ACACCGTTTT CCATGAGCAA ACTGAAACGT
TTTCATCGCT CTGGAGTGAA TACCACGACG ATTTCCGGCA GTTTCTACAC ATATATTGCG
AAGATGTGGC GTGTTACGGT GAAAACCTGG CCTATTCCC TAAAGGGTTT ATTGAGAATA
TGTGTTTCGT CTCAGCCAAT CCCTGGGTGA GTTTCACCAG TTTTGATTAA AACGTGGCCA
ATATGGACAA CTTCTCGCC CCCGTTTCA CCATGCATGG GCAAATATTAA TACGCAAGGC
GACAAGGTGC TGATGCCGCT GGCAGATTCAAG GTTCATCATG CCGTCTGTGA TGGCTTCCAT
GTCGGCAGAA TGCTTAATGA ATTACAACAG TACTGCGATG AGTGGCAGGG CGGGCGTAA
TTTTTTAAG GCAGTTATTG GTGCCCTTAA ACGCCTGGGG TAATGACTCT CTAGCTTGAG
GCATCAAATA AAACGAAAGG CTCAGTCGAA AGACTGGGCC TTTCGTTTA TCTGTTGTTT
GTCGGTGAAC GCTCTCCTGA GTAGGACAAA TCCGCGCTC TAGAGCTGCC TCGCGCGTTT
CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA CAGCTTGTCT
GTAAGCGGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG
TCGGGGCGCA GCCATGACCC AGTCACGTAG CGATAGCGGA GTGTATACTG GCTTAACAT
GCGGCATCAG AGCAGATTGT ACTGAGAGTG CACCATATGC GGTGTGAAT ACCGCAACAGA
TGCCTAAGGA GAAAATACCG CATCAGGCGC TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGACTCGCTG

CGCTCGGTCT CTGGCTCGG GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT AATACGGTTA
 TCCACAGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAG AACATGTGAG CAAAAGGCCA GAAAAGGCC
 AGGAACCGTA AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG TTTTCCATA GGCTCCGCC CCCTGACGAG
 CATCACAAAAA ATCGACGCTC AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC
 CAGGCCTTTC CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG CGCTCTCCTG TTCCGACCCCT GCCGCTTACC
 GGATACCTGT CGCCTTCT CCCTCGGG ACGGTGGCGC TTTCTCAATG CTCACGCTGT
 AGGTATCTCA GTTCGGTGTA GGTCGTTCCG TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCCC
 GTTCAGCCCC ACCGCTGCAG CTTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA
 CACGACTTAT CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA
 GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA
 TTTGGTATCT CGCCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA
 TCCGGCAAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTG TTTGCAAGCA GCAGATTACG
 CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT TTGATCTTT CTACGGGTC TGACGCTCAG
 TGGAAAGAAA ACTCACGTTA AGGGATTTG GTCATGAGAT TATCAAAAG GATCTTCACC
 TAGATCCTTT TAAATTAAAA ATGAAGTTT AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAAACT
 TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATT
 CGTTCATCCA TAGCTGCCTG ACTCCCCGTC GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGCTTA
 CCATCTGGCC CCAGTGCTGC AATGATACCG CGAGACCCAC GCTCACCGGC TCCAGATTAA
 TCAGCAATAA ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC
 GCCTCCATCC AGTCTATTAA TTGGTGCCTG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT
 AGTTTGCAC ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTCACGCTC GTCGTTGGT
 ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGGCGAG TTACATGATC CCCCATGTTG
 TGCAAAAAAG CGGTTAGCTC CTTGGTCCT CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTGGCCGCA
 GTGTTATCAC TCATGGTTAT GGCAGCACTG CATAATTCTC TTACTGTCAT GCCATCCGTA
 AGATGCTTT CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG
 CGACCGAGTT GCTCTTGCCTT GGCAGCAATA CGGGATAATA CCGCGCCACA TAGCAGAACT
 TTAAAAGTGC TCATCATGG AAAACGTTCT TCGGGGGCAA AACTCTCAAG GATCTTACCG
 CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTT
 ACTTTCACCA GCGTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA
 ATAAGGGCGA CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTCATAA TTATTGAAGC
 ATTTATCAGG GTTATTGCT CATGAGCGGA TACATATTG AATGTATTTA GAAAAATAAA
 CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCGA AAAGTGCCAC CTGACGTCTA AGAAACCATT
 ATTATCATGA CATTAAACCTA TAAAAATAGG CGTATCACGA GGGCCTTTCG TCTTCAC//

SEQ ID No. 21: pNCO-AA-Lusy

Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*

SQ SEQUENCE 3879 BP; 1005 A; 925 C; 940 G; 1009 T; 0 OTHER;
 CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA

ATTGTGAGCG CATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGCAA
 ATCTACGAAG CTAAACTAAC TGCTGAAGGC CTTCGTTCG GTATCGTAGC ATCACGTTTT
 AATCATGCTC TTGTCGACCG TCTGGTGGAG GGTGCAATTG ATTGCATAGT CCGTCATGGC
 GGCGTGAAG AAGACATTAC TCTGGTTCGT GTTCCAGGCT CATGGGAAAT ACCGGTTGCT
 GCGGGTGAAC TGGCGCGTAA AGAGGACATT GATGCTGTTA TCGCAATTGG CGTTCTCATC
 AGAGGCGCAA CGCCACATTT CGATTATATC GCCTCTGAAG TTTCAAAAGG CCTCGCGAAC
 CTTTCATTAG AACTACGTAA ACCTATCACC TTGGTGTAA TTACAGCTGA CACCTTGAA
 CAGGCTATCG AGCGCGCCGG CACAAAACAC GGCAACAAAG GTTGGGAAGC AGCGCTTTCT
 GCCATTGAAA TGGCAAACCTT ATTCAAGTCT CTCCGATAAG GATCCGTCGA CCTGCAGCCA
 AGCTTAATTAA GCTGAGCTTG GACTCCTGTT GATAGATCCA GTAATGACCT CAGAACTCCA
 TCTGGATTG TTCAGAACGC TCGGTTGCCG CCGGGCGTTT TTTATTGGTG AGAATCCAAG
 CTAGCTTGGC GAGATTTCA GGAGCTAAGG AAGCTAAAAT GGAGAAAAAA ATCACTGGAT
 ATACCACCGT TGATATATCC CAATGGCATC GTAAAGAACAA TTTTGAGGCA TTTCAGTCAG
 TTGCTCAATG TACCTATAAC CAGACCGTTC AGCTGGATAT TACGGCCTT TTAAAGACCG
 TAAAGAAAAA TAAGCACAAG TTTTATCCGG CCTTTATTCA CATTCTTGCC CGCCTGATGA
 ATGCTCATCC GGAATTCGT ATGGCAATGA AAGACGGTGA GCTGGTGATA TGGGATAGTG
 TTCACCCCTG TTACACCGTT TTCCATGAGC AACTGAAAC GTTTCATCG CTCTGGAGTG
 AATACCACGA CGATTTCCGG CAGTTCTAC ACATATATTC GCAAGATGTG GCGTGGTACG
 GTGAAAACCT GGCCTATTTC CCTAAAGGGT TTATTGAGAA TATGTTTTC GTCTCAGCCA
 ATCCCTGGGT GAGTTTCACC AGTTTGATT TAAACGTGGC CAATATGGAC AACTTCTTCG
 CCCCCGTTT CACCATGCAT GGGCAAATAT TATACGCAAG GCGACAAGGT GCTGATGCCG
 CTGGCGATTG AGGTTCATCA TGCGTCTGT GATGGCTTCC ATGTCGGCAG AATGCTTAAT
 GAATTACAAC AGTACTGCGA TGAGTGGCAG GGCAGGGCGT AATTTTTTA AGGCAGTTAT
 TGGTGCCCTT AAACGCCTGG GGTAAATGACT CTCTAGCTTG AGGCATCAAA TAAAACGAAA
 GGCTCAGTCG AAAGACTGGG CCTTCGTTT TATCTGTTGT TTGTCGGTGA ACGCTCTCCT
 GAGTAGGACA AATCCGCCGC TCTAGAGCTG CCTCGCCGTT TTCGGTGATG ACGGTGAAAA
 CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG
 CAGACAAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG TGTTGGCGGG TGTCGGGGCG CAGCCATGAC
 CCAGTCACGT AGCGATAGCG GAGTGTATAC TGGCTTAACG ATGCGGCATC AGAGCAGATT
 GTACTGAGAG TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
 CGCATCAGGC GCTCTCCGC TTCCCTCGCTC ACTGACTCGC TCGCGCTCGGT CTGTCGGCTG
 CGGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT
 AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAGGCC
 GCGTTGCTGG CGTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC
 TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA
 AGCTCCCTCG TGCGCTCTCC TGTTCCGACC CTGCGCTTA CCGGATACCT GTCCGCCCTT
 CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTCTCAA TGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTGGTG
 TAGGTCGTTG GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC
 GCCTTATCCG GTAACATATCG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG
 GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
 TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG
 CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAAACCACC

GCTGGTAGCG GTGGTTTTT TGTTTCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT
 CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AAACTCACGT
 TAAGGGATTG TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATTAA
 AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA
 TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTCATC CATAGCTGCC
 TGACTCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT
 GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA
 GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGCTCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT
 AATTGTTGCC GGGAAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTGCC CAACGTTGTT
 GCCATTGCTA CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTG GTATGGCTTC ATTCAAGCTCC
 GGTTCCAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC
 TCCTTCGGTC CTCCGATCGT TGTCAAGGT AAGTTGCCG CAGTGTATTC ACTCATGGTT
 ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
 GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCAGCCGAG TTGCTCTTGC
 CCGCGTCAA TACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAGT GCTCATCATT
 GGAAAACGTT CTTCGGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG
 ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTCAC CAGCGTTCT
 GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA
 TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT
 CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCCGCGC
 ACATTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC
 TATAAAAATA GGCGTATCAC GAGGCCCTT CGTCTTCAC//

SEQ ID No. 22: pNCO-C-Biotag-AA-Lusy

Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* mit biotinylierfähigem Peptid am C-Terminus

SQ SEQUENCE 3927 BP; 1014 A; 938 C; 958 G; 1017 T; 0 OTHER;
 CTCGAGAAAT CATAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGCAA
 ATCTACGAAG GTAAACTAAC TGCTGAAGGC CTTCTGTTCG GTATCGTAGC ATCACGTTTT
 AATCATGCTC TTGTCGACCG TCTGGTGGAG GGTGCAATTG ATTGCATAGT CCGTCATGGC
 GGCGTGAAG AAGACATTAC TCTGGTTCGT GTTCCAGGCT CATGGAAAT ACCGGTTGCT
 GCGGGTGAAC TGGCGCGTAA AGAGGACATT GATGCTGTTA TCGCAATTGG CGTTCTCATC
 AGAGGCGCAA CGCCACATTT CGATTATATC GCCTCTGAAG TTTCAAAAGG CCTCGCGAAC
 CTTCATTAG AACTACGTAA ACCTATCACC TTGGTGTGTTA TTACAGCTGA CACCTTGAA
 CAGGCTATCG AGCGCGCCGG CACAAAACAC GGCAACAAAG GTTGGGAAGC AGCGCTTCT
 GCCATTGAAA TGGCAAACCTT ATTCAAGTCT CTCCGAGCGG CGCGACTCGG CGGCATCTTC
 GAAGCTATGA AGATGGAGTG GCGCTTAAGGA TCCGTCGACC TGCAGCCAAG CTTAATTAGC
 TGAGCTTGGGA CTCCCTGTTGA TAGATCCAGT AATGACCTCA GAACTCCATC TGGATTGTT

CAGAACGGCTC GETTGGCCGCC GGGCGTTTT TATTGGTGAG AATCCAAGCT AGCTTGGCGA
GATTTTCAGG AGCTAAGGAA GCTAAATGG AGAAAAAAAT CACTGGATAT ACCACCGTTG-
ATATATCCCA ATGGCATCGT AAAGAACATT TTGAGGCATT TCAGTCAGTT GCTCAATGTA
CCTATAACCA GACCGTTCAG CTGGATATTA CGGCCTTTT AAAGACCGTA AAGAAAATA
AGCACAAAGTT TTATCCGGCC TTTATTGACA TTCTTGCCCC CCTGATGAAAT GCTCATCCGG
AATTCGTAT GGCAATGAAA GACGGTGAGC TGGTGATATG GGATAGTGTGTT CACCCCTTGTT
ACACCGTTT CCATGAGCAA ACTGAAACGT TTTCATCGCT CTGGAGTGAA TACACAGACG
ATTTCCGGCA GTTCTACAC ATATATTGCG AAGATGTGGC GTGTTACGGT GAAAACCTGG
CCTATTCCC TAAAGGGTTT ATTGAGAATA TGTTTTTCGT CTCAGCCAAAT CCCTGGGTGA
GTTTCACCAAG TTTTGATTT AACGTGGCCA ATATGGACAA CTTCTTCGCC CCCGTTTCA
CCATGCATGG GCAAATATTA TACGCCAGGC GACAAGGTGC TGATGCCGCT GGCGATTCA
GTTCATCATG CCGTCTGTGA TGGCTTCCAT GTCGGCAGAA TGCTTAATGA ATTACAACAG
TAATGCGATG AGTGGCAGGG CGGGGCGTAA TTTTTTAAG GCAGTTATTG GTGCCCTTAA
ACGCCTGGGG TAATGACTCT CTAGCTTGAG GCATCAAATA AAACGAAAGG CTCAGTCGAA
AGACTGGGCC TTTCGTTTA TCTGTTGTT GTCGGTGAAC GCTCTCCTGA GTAGGACAAA
TCCGCCCTC TAGAGCTGCC TCGCGCGTT CGGTGATGAC GGTGAAACCC TCTGACACAT
GCAGCTCCCG GAGACGGTCA CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG
TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGCGCA GCCATGACCC AGTCACGTAG
CGATAGCGGA GTGTATACTG GCTTAATCT GCGGCATCAG AGCAGATTGT ACTGAGAGTG
CACCATATGC GGTGTAAAT ACCGCACAGA TCGCTAAGGA GAAAATACCG CATCAGGCC
TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGACTCGCTG CGCTCGGTCT GTCGGCTGCC GCGAGCGGT
TCAGCTCACT CAAAGCGGT AATACGGTTA TCCACAGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAG
AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAAGGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG
TTTTCCATA GGCTCCGCC CCCTGACGAG CATCACAAAA ATCGACGCTC AAGTCAGAGG
TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG
CGCTCTCCCTG TTCCGACCCCT GCCGCTTACC GGATACCTGT CCGCCTTCT CCCTTCGGGA
AGCGTGGCGC TTTCTCAATG CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGTA GGTCGTTCGC
TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCCC GTTCAGCCCG ACCGCTGCC CTTATCCGGT
AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC AGCAGCCACT
GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG
CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT
ACCTTCCGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTGTA TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT
GGTTTTTTG TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT
TTGATCTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGGAAAGAAA ACTCACGTTA AGGGATTTG
GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTT TAAATTAAAA ATGAAGTTTT
AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT
GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGCTTATTT CGTTCATCCA TAGCTGCCG ACTCCCCGTC
GTGTAGATAA CTACGATAACG GGAGGGCTTA CCATCTGCC CCAGTGCTGC AATGATACCG
CGAGACCCAC GCTCACCGGC TCCAGATTAA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC
GAGCGCAGAA GTGGTCTGC AACTTTATCC GCCTCCATCC AGTCTATTAA TTGTTGCCGG
GAAGCTAGAG TAAAGTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTGCGCA ACGTTGTTGC CATTGCTACA
GGCATCGTGG TGTCACGCTC GTCGTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA

TCAAGGCGAG TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAG CGGTTAGCTC CTTCGGTCCT
 CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT GGCAGCACTG
 CATAATTCTC TTACTGTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTT CTGTGACTGG TGAGTACTCA
 ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG CGACCGAGTT GCTCTGCCCG GGCCTCAATA
 CGGGATAATA CCGCGCCACA TAGCAGAACT TTAAAAGTGC TCATCATTGG AAAACGTTCT
 TCGGGGCGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT
 CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTT ACTTCACCA GCGTTCTGG GTGAGCAAA
 ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA CACGGAAATG TTGAATACTC
 ATACTCTTCC TTTTCATAATA TTATTGAAGC ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA
 TACATATTTG AATGTATTAA GAAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA
 AAAGTGCCAC CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTAAACCTA TAAAAATAGG
 CGTATCACGA GGCCCTTCG TCTTCAC//

SEQ ID No.23: pNCO-His6-C-Biotag-AA-Lusy

Lumazinsynthase aus Aquifex aeolicus mit C-terminal, über einen Linker aus 6 Histidin- und 3 Alaninresten gekoppeltem, in vivo biotinylierfähigem Peptid vorliegt

SQ SEQUENCE 3945 BP; 1020 A; 947 C; 958 G; 1020 T; 0 OTHER;
 CTCGAGAAAT CATAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGCAA
 ATCTACGAAG GTAAACTAAC TGCTGAAGGC CTTCGTTCG GTATCGTAGC ATCACGTTT
 AATCATGCTC TTGTCGACCG TCTGGTGGAG GGTGCAATTG ATTGCATAGT CCGTCATGGC
 GGCGTGAAG AAGACATTAC TCTGGTTCGT GTTCCAGGCT CATGGAAAT ACCGGTTGCT
 GCGGGTGAAC TGGCGCGTAA AGAGGACATT GATGCTGTTA TCGCAATTGG CGTTCTCATC
 AGAGGCGCAA CGCCACATT CGATTATATC GCCTCTGAAG TTTCAAAAGG CCTCGCGAAC
 CTTTCATTAG AACTACGTAA ACCTATCACC TTCTGGTGTAA TTACAGCTGA CACCTGGAA
 CAGGCTATCG AGCGCGCCGG CACAAAACAC GGCAACAAAG GTTGGGAAGC AGCGCTTCT
 GCCATTGAAA TGGCAAACCT ATTCAAGTCT CTCCGACATC ACCATCACCA CCATGCGGCC
 GCACTCGCGC GCATCTTCGA AGCTATGAAG ATGGAGTGGC GCTAAGGATC CGTCGACCTG
 CAGCCAAGCT TAATTAGCTG AGCTTGGACT CCTGTTGATA GATCCAGTAA TGACCTCAGA
 ACTCCATCTG GATTGTTCA GAACGCTCGG TTGCCGCCGG GCGTTTTTA TTGGTGAGAA
 TCCAAGCTAG CTTGGCGAGA TTTTCAGGAG CTAAGGAAGC TAAAATGGAG AAAAAAATCA
 CTGGATATAC CACCGTTGAT ATATCCAAT GGCATCGTAA AGAACATTG GAGGCATTTC
 AGTCAGTTGC TCAATGTACC TATAACCAGA CCGTTCAGCT GGATATTACG GCCTTTAA
 AGACCGTAAA GAAAAATAAG CACAAGTTT ATCCGGCCTT TATTACATT CTTGCCGCC
 TGATGAATGC TCATCCGGAA TTTCGTATGG CAATGAAAGA CGGTGAGCTG GTGATATGGG
 ATAGTGTCA CCCTTGTAC ACCGTTTCC ATGAGCAAAC TGAAACGTTT TCATCGCTCT
 GGAGTGAAAT CCACGACGAT TTCCGGCAGT TTCTACACAT ATATTGCAA GATGTGGCGT

GTTACGGTGA AACCTGGCC TATTCCCTA AAGGGTTAT TGAGAATATG TTTTCGTCT
 CAGCCAATCC CTGGGTGAGT TTCACCAAGTT TTGATTTAAA CGTGGCCAAT ATGGACAAC-
 TCTTCGCCCG CGTTTCACC ATGCATGGC AAATATTATA CGCAAGGCGA CAAGGTGCTG
 ATGCCGCTGG CGATTCAAGGT TCATCATGCC GTCTGTGATG GCTTCCATGT CGGCAGAATG
 CTTAATGAAT TACAACAGTA CTGCGATGAG TGGCAGGGCG GGGCGTAATT TTTTAAGGC
 AGTTATTGGT GCCCTTAAAC GCCTGGGTA ATGACTCTCT AGCTTGAGGC ATCAAATAAA
 ACGAAAGGCT CAGTCGAAAG ACTGGGCCTT TCGTTTATC TGTTGTTGT CGGTGAACGC
 TCTCCTGAGT AGGACAAATC CGCCGCTCTA GAGCTGCCTC GCGCGTTCCG GTGATGACGG
 TGAAAACCTC TGACACATGC AGCTCCCGA GACGGTCACA GCTTGTCTGT AAGCGGATGC
 CGGGAGCAGA CAAGCCCAGTC AGGGCGCGTC AGCGGGTGTGTT GGCAGGGTGTG GGGGCGCAGC
 CATGACCCAG TCACGTAGCG ATAGCGGAGT GTATACTGGC TTAACTATGC GGCATCAGAG
 CAGATTGTAC TGAGAGTGCA CCATATGCCG TGTGAAATAC CGCACAGATG CGTAAGGAGA
 AAATACCGCA TCAGGCGCTC TTCCGCTTCC TCGCTCACTG ACTCGCTGCC CTCGGTCTGT
 CGGCTGCCGC GAGCGGTATC AGCTCACTCA AAGGCGGTAA TACGGTTATC CACAGAATCA
 GGGGATAACG CAGGAAAGAA CATGTGAGCA AAAGGCCAGC AAAAGGCCAG GAACCGTAAA
 AAGGCCCGT TGCTGGCGTT TTTCCATAGG CTCCGCCCTC CTGACGAGCA TCACAAAAAT
 CGACGCTCAA GTCAGAGGTG GCGAAACCCG ACAGGACTAT AAAGATACCA GGCCTTCCC
 CCTGGAAGCT CCCTCGTGCCT CTCTCCTGTT CCGACCCCTGC CGCTTACCGG ATACCTGTCC
 GCCTTCTCC CTTCGGGAAG CGTGGCGCTT TCTCAATGCT CACGCTGTAG GTATCTCAGT
 TCGGTGTAGG TCGTTCGCTC CAAGCTGGC TGTGTGCACG AACCCCCCGT TCAGCCGAC
 CGCTGCCCT TATCCGGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC CGGTAAGACA CGACTTATCG
 CCACTGGCAG CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGAGCGA GGTATGTAGG CGGTGCTACA
 GAGTTCTGA AGTGGTGGCC TAACTACGGC TACACTAGAA GGACAGTATT TGGTATCTGC
 GCTCTGCTGA AGCCAGTTAC CTTCGGAAAA AGAGTTGGTA GCTCTTGATC CGGCAAACAA
 ACCACCGCTG GTAGCGGTGG TTTTTTGTG TGCAAGCAGC AGATTACCGG CAGAAAAAAA
 GGATCTCAAG AAGATCCTT GATCTTTCT ACGGGGTCTG ACGCTCAGTG GAACGAAAAC
 TCACGTTAAG GGATTTGGT CATGAGATTA TCAAAAGGA TCTTCACCTA GATCCTTTA
 AATTAAAAAT GAAGTTTAA ATCAATCTAA AGTATATATG AGTAAACCTG GTCTGACAGT
 TACCAATGCT TAATCAGTGA GGCACCTATC TCAGCGATCT GTCTATTTCG TTCATCCATA
 GCTGCTGAC TCCCCGTCGT GTAGATAACT ACGATAACGGG AGGGCTTACC ATCTGCCCG
 AGTGCTGCAA TGATACCGCG AGACCCACGC TCACCGGCTC CAGATTATC AGCAATAAAC
 CAGCCAGCCG GAAGGGCCGA GCGCAGAAGT GGTCTGCAA CTTTATCCGC CTCCATCCAG
 TCTATTAATT GTTGCCTGG AGCTAGAGTA AGTAGTTCGC CAGTTAATAG TTTGCGAAC
 GTTGTGCCA TTGCTACAGG CATCGTGGTG TCACGCTCGT CGTTGGTAT GGCTTCATT
 AGCTCCGGTT CCCAACGATC AAGGCCAGTT ACATGATCCC CCATGTTGTG CAAAAAAGCG
 GTTAGCTCCT TCGGTCTCC GATCGTTGTC AGAAGTAAGT TGGCCGCAGT GTTATCACT
 ATGGTTATGG CAGCACTGCA TAATTCTCTT ACTGTCATGC CATCCGTAAG ATGCTTTCT
 GTGACTGGTG AGTACTCAAC CAAAGTCATTC TGAGAATAGT GTATGCGGC ACCGAGTTGC
 TCTTGCCCGG CGTCAATAAG GGATAATACC GCGCCACATA GCAGAACTTT AAAAGTGCTC
 ATCATTGGAA AACGTTCTTC GGGGCGAAAA CTCTCAAGGA TCTTACCGCT GTTGAGATCC
 AGTTCGATGT AACCCACTCG TGCAACCAAC TGATCTTCAG CATCTTTAC TTTCACCAAGC
 GTTTCTGGGT GAGCAAAAC AGGAAGGCAA AATGCCGCAA AAAAGGGAAT AAGGGCGACA

CGGAAATGTT GAATACTCAT ACTCTTCCTT TTTCAATATT ATTGAAGCAT TTATCAGGGT
 TATTGTCTCA TGAGCGGATA CATATTTGAA TGTATTTAGA AAAATAAACAA AATAGGGTT
 CCGCGCACAT TTCCCCGAAA AGTGCCACCT GACGTCTAAG AAACCATTAT TATCATGACA
 TTAACCTATA AAAATAGGCG TATCACGAGG CCCTTCGTC TTCAC//

SEQ ID No. 24: pNCO-His6-GLY2-SER-GLY-C-Biotag-AA-Lusy

Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* mit C-terminal, über einen Linker bestehend aus der Aminosäurenfolge HHHHHHGGSGAAA gekoppeltem, *in vivo* biotinylierfähigem Peptid vorliegt

SQ SEQUENCE 3957 BP; 1020 A; 950 C; 964 G; 1023 T; 0 OTHER;
 CTCGAGAAAT CATAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGCAA
 ATCTACGAAG GTAAAACTAAC TGCTGAAGGC CTTCGTTCG GTATCGTAGC ATCACGTTT
 AATCATGCTC TTGTCGACCG TCTGGTGGAG GGTGCAATTG ATTGCATAGT CCGTCATGGC
 GGCGTGAAG AAGACATTAC TCTGGTTCGT GTTCCAGGCT CATGGGAAAT ACCGGTTGCT
 GCGGGTGAAC TGGCGCGTAA AGAGGACATT GATGCTGTTA TCGCAATTGG CGTTCTCATC
 AGAGGCGCAA CGCCACATTT CGATTATATC GCCTCTGAAG TTTCAAAAGG CCTCGCGAAC
 CTTTCATTAG AACTACGTAA ACCTATCACC TTCGGTGTAA TTACAGCTGA CACCTTGGAA
 CAGGCTATCG AGCGCGCCGG CACAAAACAC GGCAACAAAAG GTTGGGAAGC AGCGCTTTCT
 GCCATTGAAA TGGCAAACCTT ATTCAAGTCT CTCCGACATC ACCATCACCA CCATGGCGGT
 TCTGGCGCGG CCGCACTCGG CGGCATCTTC GAAGCTATGA AGATGGAGTG GCGCTAAGGA
 TCCGTCGACC TGCAGCCAAG CTTAATTAGC TGAGCTTGGA CTCCTGTTGA TAGATCCAGT
 AATGACCTCA GAACTCCATC TGGATTGTT CAGAACGCTC GGTTGCCGCC GGGCGTTTT
 TATTGGTGAG AATCCAAGCT AGCTTGGCGA GATTTCAAGG AGCTAAGGAA GCTAAAATGG
 AGAAAAAAAT CACTGGATAT ACCACCCTTG ATATATCCCA ATGGCATCGT AAAGAACATT
 TTGAGGCATT TCAGTCAGTT GCTCAATGTA CCTATAACCA GACCGTTCAAG CTGGATATT
 CGGCCTTTAA AAGACCGTA AAGAAAAATA AGCACAAAGTT TTATCCGCC TTTATTACAA
 TTCTTGCCCG CCTGATGAAT GCTCATCCGG AATTCGTAT GGCAATGAAA GACGGTGAGC
 TGGTGATATG GGATAGTGT CACCCCTGTT ACACCCTTT CCATGAGCAA ACTGAAACGT
 TTTCATCGCT CTGGAGTGAA TACACGACG ATTTCCGGCA GTTTCTACAC ATATATTCGC
 AAGATGTGGC GTGTTACGGT GAAAACCTGG CCTATTTCCC TAAAGGGTTT ATTGAGAATA
 TGTTTTCGT CTCAGCCAAT CCCTGGGTGA GTTTCACCAAG TTTTGATTAA AACGTGGCCA
 ATATGGACAA CTTCTTCGCC CCCGTTTCA CCATGCATGG GCAAATATTA TACGCAAGGC
 GACAAGGTGC TGATGCCGCT GGCAGATTCAAG GTTCATCATG CCGTCTGTGA TGGCTTCCAT
 GTCGGCAGAA TGCTTAATGA ATTACAACAG TACTGCGATG AGTGGCAGGG CGGGCGTAA
 TTTTTTAAG GCAGTTATTG GTGCCCTTAA ACGCCTGGGG TAATGACTCT CTAGCTTGAG
 GCATCAAATA AACGAAAGG CTCAGTCGAA AGACTGGGCC TTTCGTTTTA TCTGTTGTT
 GTCGGTGAAC GCTCTCCTGA GTAGGACAAA TCCGCCGCTC TAGAGCTGCC TCGCGCGTTT

CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA CAGCTTGTCT
 GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG
 TCGGGGCGCA GCCATGACCC AGTCACGTAG CGATAGCGGA GTGTATACTG GCTTAACTAT
 GCGGCATCAG AGCAGATTGT ACTGAGAGTG CACCATATGC GGTGTGAAAT ACCGCACAGA
 TGCCTAAGGA GAAAATACCG CATCAGGGCGC TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGACTCGCTG
 CGCTCGGTCT GTCCGGCTGCG GCGAGCGGT A TCAGCTCACT CAAAGGGCGT AATACGGTTA
 TCCACAGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAG AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAAGGCC
 AGGAACCGTA AAAAGGCCGC GTTGCCTGGCG TTTTCCATA GGCTCCGCC CCCTGACGAG
 CATCACAAAA ATCGACGCTC AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC
 CAGGCCTTTC CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG CGCTCTCCTG TTCCGACCCCT GCCGCTTACC
 GGATACCTGT CCGCCTTCT CCCTCGGGA AGCGTGGCGC TTTCTCAATG CTCACGCTGT
 AGGTATCTCA GTTCGGTGTA GGTCGTTCGC TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCCC
 GTTCAGCCCC ACCGCTGCGC CTTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA
 CACGACTTAT CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA
 GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA
 TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA
 TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTG TTGCAAGCA GCAGATTACG
 CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT TTGATCTTT CTACGGGTC TGACGCTCAG
 TGGAACGAAA ACTCACGTTA AGGGATTTG GTCATGAGAT TATAAAAAG GATCTTCACC
 TAGATCCTT TAAATTAAA ATGAAGTTTT AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAAACT
 TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT
 CGTTCATCCA TAGCTGCCCTG ACTCCCCGTC GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGCTTA
 CCATCTGGCC CCAGTGTGCA AATGATACCG CGAGACCCAC GCTCACCGGC TCCAGATTAA
 TCAGCAATAA ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC
 GCCTCCATCC AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT
 AGTTTGCAC ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTCACGCTC GTCGTTGGT
 ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGGCAG TTACATGATC CCCCATGTTG
 TGCAAAAAAG CGGTTAGCTC CTTGGTCCT CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA
 GTGTTATCAC TCATGGTTAT GGCAGCACTG CATAATTCTC TTACTGTCAT GCCATCCGTA
 AGATGCTTT CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG
 CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GGCCTCAATA CGGGATAATA CCGCGCCACA TAGCAGAACT
 TTAAAAGTGC TCATCATTGG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG
 CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTT
 ACTTTACCA GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA
 ATAAGGGCGA CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTCC TTTTCATAA TTATTGAAGC
 ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTG AATGTATTTA GAAAATAAA
 CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA AAAGTGCAC CTGACGTCTA AGAAACCATT
 ATTATCATGA CATTAAACCTA TAAAATAGG CGTATCACGA GGCCCTTTCG TCTTCAC//"

SEQ ID No. 25: pNCO-BS-LuSy-AgeI-AA-Lusy

Chimäre Protein bestehend aus einem Teil der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* und einem Teil der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*.

SQ SEQUENCE 3879 BP; 1020 A; 914 C; 940 G; 1005 T; 0 OTHER;
 CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGAAT
 ATCATACAAG GAAATTTAGT TGGTACAGGT CTTAAAATCG GAATCGTAGT AGGAAGATT
 AATGATTTA TTACGAGCAA GCTGCTGAGC GGAGCAGAAG ATGCGCTGCT CAGACATGGC
 GTAGACACAA ATGACATTGA TGTGGCTTGG GTTCCAGCG CATTGAAAT ACCGGTTGCT
 GCGGGTGAAC TGGCGCGTAA AGAGGACATT GATGCTGTTA TCGCAATTGG CGTTCTCATC
 AGAGGGCGCAA CGCCACATT CGATTATATC GCCTCTGAAG TTTCAAAAGG CCTCGCGAAC
 CTTTCATTAG AACTACGTAACCTATCACC TTCGGTGTAA TTACAGCTGA CACCTTGGAA
 CAGGCTATCG AGCGCGCCGG CACAAAACAC GGCAACAAAG GTTGGGAAGC AGCGCTTCT
 GCCATTGAAA TGGCAAACATT ATTCAAGTCT CTCCGATAAG GATCCGTCGA CCTGCAGCCA
 AGCTTAATTAA GCTGAGCTTG GACTCCTGTT GATAGATCCA GTAATGACCT CAGAACTCCA
 TCTGGATTG TTCAGAACGC TCGGTTGCCG CCGGCGTTT TTTATTGGTG AGAATCCAAG
 CTAGCTTGGC GAGATTTCA GGAGCTAAGG AAGCTAAAT GGAGAAAAAA ATCACTGGAT
 ATACCACCGT TGATATATCC CAATGGCATC GTAAAGAACAA TTTTGAGGCA TTTCAGTCAG
 TTGCTCAATG TACCTATAAC CAGACCGTTC AGCTGGATAT TACGGCTTT TTAAAGACCG
 TAAAGAAAAAA TAAGCACAAG TTTTATCCGG CCTTTATTCA CATTCTGCC CGCCTGATGA
 ATGCTCATCC GGAATTCGT ATGGCAATGA AAGACGGTGA GCTGGTGATA TGGGATAGTG
 TTCACCCCTTG TTACACCGTT TTCCATGAGC AAACTGAAAC GTTTTCATCG CTCTGGAGTG
 AATACCAACGA CGATTTCCGG CAGTTCTAC ACATATATTG GCAAGATGTG GCGTGTACG
 GTGAAAACCT GGCCTATTTC CCTAAAGGGT TTATTGAGAA TATGTTTTC GTCTCAGCCA
 ATCCCTGGGT GAGTTTCACC AGTTTGATT TAAACGTGGC CAATATGGAC AACTTCTTCG
 CCCCCGTTT CACCATGCAT GGGCAAATAT TATACGCAAG GCGACAAGGT GCTGATGCCG
 CTGGCGATTC AGGTTCATCA TGCCGCTGT GATGGCTTCC ATGTCGGCAG AATGCTTAAT
 GAATTACAAC AGTACTGCGA TGAGTGGCAG GGCGGGGCGT AATTTTTA AGGCAGTTAT
 TGGTGCCTT AAACGCTTGG GGTAATGACT CTCTAGCTTG AGGCATCAA TAAAACGAAA
 GGCTCAGTCG AAAGACTGGG CCTTCGTTT TATCTGTTGT TTGTCGGTGA ACGCTCTCCT
 GAGTAGGACA ATCCGCCGC TCTAGAGCTG CCTCGCGCGT TTGGTGTGATG ACGGTGAAAAA
 CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG
 CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGG TGTTGGCGGG TGTCGGGGCG CAGCCATGAC
 CCAGTCACGT AGCGATAGCG GAGTGTATAC TGGCTTAACG ATGCGGCATC AGAGCAGATT
 GTACTGAGAG TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
 CGCATCAGGC GCTCTCCGC TTCCCTGCTC ACTGACTCGC TGCCTCGGT CTGTCGGCTG
 CGGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT
 AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC
 GCGTTGCTGG CGTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC
 TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCCTT TCCCCCTGGA
 AGCTCCCTCG TGCCTCTCC TGTTCCGACC CTGCGCTTA CGGATACCT GTCCGCCTT
 CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTCTCAA TGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTGGTG

TAGGTCGTTG GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGGCC CGACCGCTGC
 GCCTTATCCG GTAACTATCG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG
 GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
 TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG
 CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAAACCACC
 GCTGGTAGCG GTGGTTTTT TGTGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT
 CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AAACTCACGT
 TAAGGGATTG TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATTAA
 AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA
 TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTCATC CATAGCTGCC
 TGACTCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT
 GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA
 GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAAACTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT
 AATTGTTGCC GGGAAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTGCG CAACGTTGTT
 GCCATTGCTA CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTG GTATGGCTTC ATTCAAGCTCC
 GGTTCCCAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCCATGT TGTGAAAAA AGCGGTTAGC
 TCCTTCGGTC CTCCGATCGT TGTAGAAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTATC ACTCATGGTT
 ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
 GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCGACCGAG TTGCTCTTGC
 CCGCGTCAA TACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT
 GGAAAACGTT CTTCGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG
 ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATTCT TTACTTTCAC CAGCGTTCT
 GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA
 TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT
 CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCCGCGC
 ACATTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC
 TATAAAAATA GGCGTATCAC GAGGCCCTT CGTCTTCAC//"

SEQ ID No. 26: pNCO-AA-BglII-Lusy

Vektor zur Fusion von Fremdpeptiden an den N-Terminus der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* unter Verwendung der Restriktionsendonuklease BglII.

SEQUENCE 3879 BP; 1004 A; 925 C; 941 G; 1009 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAT CATAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGCAG
 ATCTACGAAG GTAAACTAAC TGCTGAAGGC CTTCGTTTCG GTATCGTAGC ATCACGTTT
 AATCATGCTC TTGTCGACCG TCTGGTGGAG GGTGCAATTG ATTGCATAGT CCGTCATGGC
 GGCGGTGAAG AAGACATTAC TCTGGTTCGT GTTCCAGGCT CATGGGAAAT ACCGGTTGCT

GCGGGTGAAC TGGCGCGTAA AGAGGACATT GATGCTGTTA TCGCAATTGG CGTTCTCATC
 AGAGGCGCAA CGCCACATTT CGATTATATC GCCTCTGAAG TTTCAAAAGG CCTCGCGAAC
 CTTTCATTAG AACTACGTAA ACCTATCACC TTCGGTGTAA TTACAGCTGA CACCTTGGAA
 CAGGCTATCG AGCGCGCCGG CACAAAACAC GGCAACAAAG GTTGGGAAGC AGCGCTTCT
 GCCATTGAAA TGGCAAACCT ATTCAAGTCT CTCCGATAAG GATCCGTCGA CCTGCAGCCA
 AGCTTAATTAA GCTGAGCTT GACTCCTGTT GATAGATCCA GTAATGACCT CAGAACTCCA
 TCTGGATTG TTCAGAACGC TCGGTTGCCG CCGGGCGTTT TTTATTGGTG AGAATCCAAG
 CTAGCTTGGC GAGATTTCA GGAGCTAAGG AAGCTAAAAT GGAGAAAAAA ATCACTGGAT
 ATACCACCGT TGATATATCC CAATGGCATE GTAAAGAACAA TTTTGAGGCA TTTCAGTCAG
 TTGCTCAATG TACCTATAAC CAGACCGTTC AGCTGGATAT TACGGCCTTT TTAAAGACCG
 TAAAGAAAAAA TAAGCACAAG TTTTATCCGG CCTTTATTCA CATTCTTGCC CGCCTGATGA
 ATGCTCATCC GGAATTCGT ATGGCAATGA AAGACGGTGA GCTGGTGATA TGGGATAGTG
 TTCACCCCTTG TTACACCGTT TTCCATGAGC AAACTGAAAC GTTTCATCG CTCTGGAGTG
 AATACCACGA CGATTTCCGG CAGTTCTAC ACATATATTC GCAAGATGTG GCGTGGTACG
 GTGAAAACCT GGCCTATTTC CCTAAAGGGT TTATTGAGAA TATGTTTTTC GTCTCAGCCA
 ATCCCTGGGT GAGTTTCACC AGTTTGATT TAAACGTGGC CAATATGGAC AACTTCTCG
 CCCCCGTTT CACCATGCAT GGGCAAATAT TATACGCAAG GCGACAAGGT GCTGATGCCG
 CTGGCGATTTC AGGTTCATCA TGCCGTCTGT GATGGCTTCC ATGTCGGCAG AATGCTTAAT
 GAATTACAAC AGTACTGCGA TGAGTGGCAG GGCAGGGCGT AATTTTTTA AGGCAGTTAT
 TGGTGCCCTT AAACGCCTGG GGTAATGACT CTCTAGCTT GAGGCATAAA TAAAACGAAA
 GGCTCAGTCG AAAGACTGGG CCTTCGTTT TATCTGTTGT TTGTCGGTGA ACGCTCTCCT
 GAGTAGGACA AATCCGCCGC TCTAGAGCTG CCTCGCGCGT TTGGTGTATG ACGGTGAAAA
 CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTGT CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG
 CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG TGTTGGCGGG TGTCGGGGCG CAGCCATGAC
 CCAGTCACGT AGCGATAGCG GAGTGTATAC TGGCTTAAC ATGCCGCATC AGAGCAGATT
 GTACTGAGAG TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
 CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCCCTCGCT ACTGACTCGC TGCGCTCGGT CTGTCGGCTG
 CGGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT
 AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAGGCC
 GCGTTGCTGG CGTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCCCTGACG AGCATCACAA AAATGACGC
 TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCCTT TCCCCCTGGA
 AGCTCCCTCG TGCCTCTCC TGTTCCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT GTCCGCCTT
 CTCCCTCGG GAAAGCGTGGC GCTTCCTCAA TGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTCGGTG
 TAGGTGGTTC GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTAGGCC CGACCGCTGC
 GCCTTATCCG GTAACTATCG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG
 GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
 TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTGGTAT CTGCGCTCTG
 CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAAACCACC
 GCTGGTAGCG GTGGTTTTTG TGTTGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT
 CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AAACTCACGT
 TAAGGGATTT TGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATTAA
 AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA

TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCGCG ATCTGTCTAT TTCTGTTCAATC CATAAGCTGCC
 TGAATCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT
 GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA
 GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT
 AATTGTTGCC GGGAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTGCCG CAACGTTGTT
 GCCATTGCTA CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTG GTATGGCTTC ATTCAAGCTCC
 GGTTCCCAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC
 TCCTTCGGTC CTCCGATCGT TGTCAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTATC ACTCATGGTT
 ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTAATGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
 GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCGACCGAG TTGCTCTTGC
 CCGCGTCAA TACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAGT GCTCATCATT
 GGAAAACGTT CTTCGGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG
 ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTCAC CAGCGTTCT
 GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA
 TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT
 CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCCGCGC
 ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC
 TATAAAAATA GGCGTATCAC GAGGCCCTT CGTCTTCAC//

SEQ ID No.27: pNCO-AA-Lusy- (BamHI)

Vektor zur Fusion von Fremdpeptiden an den C-Terminus der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* unter Verwendung der Restriktionsendnuklease BamHI.

SEQUENCE 3876 BP; 1003 A; 925 C; 940 G; 1008 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAT CATAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGCAA
 ATCTACGAAG GTAAAACAAAC TGCTGAAGGC CTTCGTTTCG GTATCGTAGC ATCACGTTT
 AATCATGCTC TTGTCGACCG TCTGGTGGAG GGTGCAATTG ATTGCATAGT CCGTCATGGC
 GGCGTGAAG AAGACATTAC TCTGGTCGT GTTCCAGGCT CATGGAAAT ACCGGTTGCT
 GCGGGTGAAC TGGCGCGTAA AGAGGACATT GATGCTGTTA TCGCAATTGG CGTTCTCATC
 AGAGGGCGCAA CGCCACATTT CGATTATATC GCCTCTGAAG TTTCAAAAGG CCTCGCGAAC
 CTTTCATTAG AACTACGTAA ACCTATCACC TTCCGGTGTAA TTACAGCTGA CACCTTGGAA
 CAGGCTATCG AGCGCGCCGG CACAAACAC GGCAACAAAG GTTGGGAAGC AGCGCTTTCT
 GCCATTGAAA TGGCAAACCT ATTCAAGTCT CTCCGAGGAT CCGTCGACCT GCAGCCAAGC
 TTAATTAGCT GAGCTTGGAC TCCTGTTGAT AGATCCAGTA ATGACCTCAG AACTCCATCT
 GGATTTGTTGAGAACGCTCG GTTGGCGCCG GGCCTTTTT ATTGGTGAGA ATCCAAGCTA
 GCTTGGCGAG ATTTTCAGGA GCTAAGGAAG CTAAAATGGA GAAAAAAATC ACTGGATATA
 CCACCGTTGA TATATCCCAA TGGCATCGTA AAGAACATT TGAGGCATT TGAGTCAGTTG

CTCAAATGTAC CTATAACCAG ACCGTTCAAGC TGGATATTAC GGCTTTTA AAGACCGTAA
 AGAAAAATAA GCACAAGTTT TATCCGGCCT TTATTCACAT TCTTGCCCGC CTGATGAATG
 CTCATCCGGA ATTTCGTATG GCAATGAAAG ACGGTGAGCT GGTGATATGG GATAGTGTTC
 ACCCTGTCA CACCGTTTC CATGAGCAAA CTGAAACGTT TTCATCGCTC TGGAGTGAAT
 ACCACGACGA TTTCCGGCAG TTTCTACACA TATATTGCA AGATGTGGCG TGTTACGGTG
 AAAACCTGGC CTATTCCTC AAAGGTTTA TTGAGAATAT GTTTTCGTC TCAGCCAATC
 CCTGGGTGAG TTTCACCAGT TTTGATTTAA ACGTGGCCAA TATGGACAAAC TTCTTCGCC
 CCGTTTCAC CATGCATGGG CAAATATTAT ACGCAAGGCG ACAAGGTGCT GATGCCGCTG
 GCGATTCAAGG TTCATCATGC CGTCTGTGAT GGCTTCCATG TCGGCAGAAT GCTTAATGAA
 TTACAACAGT ACTGCGATGA GTGGCAGGGC GGGGCGTAAT TTTTTAAGG CAGTTATTGG
 TGCCCTTAAA CGCCTGGGT AATGACTCTC TAGCTTGAGG CATCAAATAA AACGAAAGGC
 TCAGTCGAAA GACTGGCCT TTGTTTTAT CTGTTGTTG TCGGTGAACG CTCTCCTGAG
 TAGGACAAAT CCGCCGCTCT AGAGCTGCCT CGCGCGTTTC GGTGATGACG GTGAAAACCT
 CTGACACATG CAGCTCCGG AGACGGTCAC AGCTTGTCTG TAAGCGGATG CCGGGAGCAG
 ACAAGCCCGT CAGGGCGCGT CAGCGGGTGT TGGCGGGTGT CGGGGCGCAG CCATGACCCA
 GTCACGTAGC GATAGCGGAG TGTATACTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA
 CTGAGAGTGC ACCATATGCG GTGTGAAATA CCGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC
 ATCAGGCGCT CTTCCGCTTC CTCGCTCACT GACTCGCTGC GCTCGGTCTG TCGGCTGCC
 CGAGCGGTAT CAGCTCACTC AAAGGCGGTAA ATACGGTTAT CCACAGAAATC AGGGGATAAC
 GCAGGAAAGA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA GGAACCGTAA AAAGGCCGCG
 TTGCTGGCGT TTTTCCATAG GCTCCGCCCG CCTGACGAGC ATCACAAAAA TCGACGCTCA
 AGTCAGAGGT GGCAGAACCC GACAGGACTA TAAAGATACC AGGCGTTCC CCCTGGAAAGC
 TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT TCCGACCCCTG CCGCTTACCG GATACTGTC CGCCTTCTC
 CCTTCGGGAA GCGTGGCGCT TTCTCAATGC TCACGCTGTA GGTATCTCAG TTCGGTGTAG
 GTCGTTCGCT CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCCCG TTCAGCCGA CCGCTGCC
 TTATCCGGTA ACTATCGTCT TGAGTCCAAC CCGGTAAGAC ACGACTTATC GCCACTGGCA
 GCAGCCACTG GTAACAGGAT TAGCAGAGCG AGGTATGTAG GCGGTGCTAC AGAGTTCTG
 AAGTGGTGGC CTAACACTACGG CTACACTAGA AGGACAGTAT TTGGTATCTG CGCTCTGCTG
 AAGCCAGTTA CCTTCGGAAA AAGAGTTGGT AGCTCTGAT CCGGCAAACA AACCAACGCT
 GGTAGCGGTG GTTTTTTGT TTGCAAGCAG CAGATTACGC GCAGAAAAAA AGGATCTCAA
 GAAGATCCTT TGATCTTTC TACGGGGTCT GACGCTCAGT GGAACGAAAAA CTCACGTTAA
 GGGATTTGG TCATGAGATT ATCAAAAAGG ATCTTCACCT AGATCCTTTT AAATAAAAAA
 TGAAGTTTA AATCAATCTA AAGTATATAT GAGTAAACTT GGTCTGACAG TTACCAATGC
 TTAATCAGTG AGGCACCTAT CTCAGCGATC TGTCTATTTC GTTCATCCAT AGCTGCC
 CTCCCCGCTG TGTAGATAAC TACGATACGG GAGGGCTTAC CATCTGGCCC CAGTGTGCA
 ATGATACCGC GAGACCCACG CTCACCGGCT CCAGATTAT CAGCAATAAA CCAGCCAGCC
 GGAAGGGCCG AGCGCAGAAG TGGTCTGCA ACTTTATCCG CCTCCATCCA GTCTATTAAT
 TGTTGCCGGG AAGCTAGAGT AAGTAGTTCG CCAGTTAATA GTTGCGCAA CGTTGTTGCC
 ATTGCTACAG GCATCGTGGT GTCACGCTCG TCGTTGGTA TGGCTTCATT CAGCTCCGGT
 TCCCAACGAT CAAGGCGAGT TACATGATCC CCCATGTTGT GCAAAAAAGC GGTTAGCTCC
 TTCGGTCCTC CGATCGTTGT CAGAAGTAAG TTGGCCGCAG TGTTATCACT CATGGTTATG
 GCAGCACTGC ATAATTCTCT TACTGTATG CCATCCGTAA GATGCTTTTC TGTGACTGGT

GAGTACTCAA CCAAGTCATT CTGAGAATAG TGTATGCGGC GACCGAGTTG CTCTTGCCTG
 GCGTCAATAC GGGATAATAC CGCGCCACAT AGCAGAACTT TAAAAGTGC CATCATTGGA
 AACAGTTCTT CGGGGCGAAA ACTCTCAAGG ATCTTACCGC TGTTGAGATC CAGTCGATG
 TAACCCACTC GTGCACCCAA CTGATCTTCA GCATCTTTA CTTTCACCAG CGTTTCTGGG
 TGAGCAAAAA CAGGAAGGCA AAATGCCGCA AAAAAGGGAA TAAGGGCGAC ACGGAAATGT
 TGAATACTCA TACTCTTCCCT TTTCAATAT TATTGAAGCA TTATCAGGG TTATTGTCTC
 ATGAGCGGAT ACATATTGA ATGTATTTAG AAAAATAAAC AAATAGGGGT TCCGCGCACA
 TTTCCCCGAA AAGTGCCACC TGACGTCTAA GAAACCATTA TTATCATGAC ATTAACCTAT
 AAAAATAGGC GTATCACGAG GCCCTTTCGT CTTCAC//

SEQ ID No. 28: pNCO-AA-BgIII-Lusy- (BamHI)

Vektor zur Fusion von Fremdpeptiden an den N- und an den C-Terminus der thermostabilen Lumazinsynthase aus Aquifex aeolicus unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen BgIII und BamHI.

SEQUENCE 3876 BP; 1002 A; 925 C; 941 G; 1008 T; 0 OTHER;
 CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGCAG
 ATCTACGAAG GTAAACTAAC TGCTGAAGGC CTTCGTTTCG GTATCGTAGC ATCACGTTTT
 AATCATGCTC TTGTCGACCG TCTGGTGGAG GGTGCAATTG ATTGCATAGT CCGTCATGGC
 GGCGTGAAG AAGACATTAC TCTGGTTCGT GTTCCAGGCT CATGGAAAT ACCGGTTGCT
 GCGGGTGAAC TGGCGCGTAA AGAGGACATT GATGCTGTTA TCGCAATTGG CGTTCTCATC
 AGAGGCGCAA CGCCACATT CGATTATATC GCCTCTGAAG TTTCAAAAGG CCTCGCGAAC
 CTTTCATTAG AACTACGTAA ACCTATCACC TTCGGTGTAA TTACAGCTGA CACCTTGGAA
 CAGGCTATCG AGCGCGCCGG CACAAAACAC GGCAACAAAG GTTGGGAAGC AGCGCTTCT
 GCCATTGAAA TGGCAAACATT ATTCAAGTCT CTCCGAGGAT CCGTCGACCT GCAGCCAAGC
 TTAATTAGCT GAGCTTGGAC TCCTGTTGAT AGATCCAGTA ATGACCTCAG AACTCCATCT
 GGATTTGTT AGAACGCTCG GTTGCCGCCG GGCCTTTTT ATTGGTGAGA ATCCAAGCTA
 GCTTGGCGAG ATTTTCAGGA GCTAAGGAAG CTAAAATGGA GAAAAAAATC ACTGGATATA
 CCACCGTTGA TATATCCCAA TGGCATCGTA AAGAACATT TGAGGCATTT CAGTCAGTTG
 CTCAATGTAC CTATAACCAG ACCGTTTCAGC TGGATATTAC GGCCTTTTA AAGACCGTAA
 AGAAAAATAA GCACAAGTTT TATCCGGCCT TTATTACAT TCTTGCCTGC CTGATGAATG
 CTCATCCGGA ATTTCGTATG GCAATGAAAG ACGGTGAGCT GGTGATATGG GATAGTGTTC
 ACCCTTGTAA CACCGTTTC CATGAGCAA CTGAAACGTT TTCATCGCTC TGGAGTGAAT
 ACCACGACGA TTTCCGGCAG TTTCTACACA TATATTGCA AGATGTGGCG TGTTACGGTG
 AAAACCTGGC CTATTTCCCT AAAGGGTTTA TTGAGAATAT GTTTTCGTC TCAGCCAATC
 CCTGGGTGAG TTTCACCAGT TTTGATTTAA ACGTGGCCAA TATGGACAAC TTCTTCGCC
 CCGTTTCAC CATGCATGGG CAAATATTAT ACGCAAGGCG ACAAGGTGCT GATGCCGCTG
 GCGATTCAAGG TTCATCATGC CGTCTGTGAT GGCTTCCATG TCGGCAGAAT GCTTAATGAA

TTACAAACAGT ACTGCGATGA GTGGCAGGGC GGGGCGTAAT TTTTTAAGG CAGTATTGG
TGCCTTAAA CGCCTGGGT AATGACTCTC TAGCTTGAGG CATCAAATAA AACGAAAGGC
TCAGTCGAA GACTGGGCCT TTCTGTTTAT CTGTTGTTG TCGGTGAAACG CTCTCCTGAG
TAGGACAAAT CCGCCGCTCT AGAGCTGCCT CGCGCGTTTC GGTGATGACG GTGAAAACCT
CTGACACATG CAGCTCCCG AGACGGTCAC AGCTTGTCTG TAAGCGGATG CCGGGAGCAG
ACAAGCCCCT CAGGGCGCGT CAGCGGGTGT TGGCGGGTGT CGGGGCGCAG CCATGACCCA
GTCACGTAGC GATAGCGGAG TGTATACTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA
CTGAGAGTGC ACCATATGCG GTGTGAAATA CCGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC
ATCAGGGCGCT CTTCCGCTTC CTCGCTCACT GACTCGCTGC GCTCGGTCTG TCGGCTGCAG
CGAGCGGTAT CAGCTCACTC AAAGGCGGTA ATACGGTTAT CCACAGAATC AGGGGATAAC
GCAGGAAAGA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA GGAACCGTAA AAAGGCCGCG
TTGCTGGCGT TTTTCCATAG GCTCCGCCCG CCTGACGAGC ATCACAAAAA TCGACGCTCA
AGTCAGAGGT GGCGAAACCC GACAGGACTA TAAAGATACC AGGCCTTCC CCCTGGAAGC
TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT TCCGACCCCTG CCGCTTACCG GATACTGTC CGCCTTCTC
CCTTCGGGAA GCGTGGCGCT TTCTCAATGC TCACGCTGTA GGTATCTCAG TTCGGTGTAG
GTCGTTCGCT CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCCCG TTCAGCCCGA CGCCTGCGCC
TTATCCGGTA ACTATCGTCT TGAGTCCAAC CCGGTAAGAC ACGACTTATC GCCACTGGCA
GCAGCCACTG GTAACAGGAT TAGCAGAGCG AGGTATGTAG GCGGTGCTAC AGAGTTCTTG
AAGTGGTGGC CTAACTACGG CTACACTAGA AGGACAGTAT TTGGTATCTG CGCTCTGCTG
AAGCCAGTTA CCTTCGGAAA AAGAGTTGGT AGCTTTGAT CGGGCAAACA AACCACCGCT
GGTAGCGGTG GTTTTTTGT TTGCAAGCAG CAGATTACGC GCAGAAAAAAA AGGATCTCAA
GAAGATCCTT TGATCTTTC TACGGGGTCT GACGCTCAGT GGAACGAAAAA CTCACGTTAA
GGGATTTGG TCATGAGATT ATCAAAAAGG ATCTTCACCT AGATCCTTTT AAATTAACAA
TGAAGTTTA AATCAATCTA AAGTATATAT GAGTAAACTT GGTCTGACAG TTACCAATGC
TTAACAGTG AGGCACCTAT CTCAGCGATC TGTCTATTTC GTTCATCCAT AGCTGCCCTGA
CTCCCCGTG TGAGATAAC TACGATACGG GAGGGCTTAC CATCTGGCCC CAGTGTGCA
ATGATACCGC GAGACCCACG CTCACCGGCT CCAGATTAT CAGCAATAAA CCAGCCAGCC
GGAAGGGCCG AGCGCAGAAG TGCTCCTGCA ACTTTATCCG CCTCCATCCA GTCTATTAAT
TGTTGCCGGG AAGCTAGAGT AAGTAGTTG CCAGTTAATA GTTGCCTCAA CGTTGTTGCC
ATTGCTACAG GCATCGTGGT GTCACTGCTG TCGTTGGTA TGGCTTCATT CAGCTCCGGT
TCCCAACGAT CAAGGCAGGT TACATGATCC CCCATGTTGT GCAAAAGC GGTTAGCTCC
TTCGGTCCTC CGATCGTTGT CAGAAGTAAG TTGGCCGCAG TGTTATCAGT CATGGTTATG
GCAGCACTGC ATAATTCTCT TACTGTCTG CCATCCGTA GATGCTTTT TGTGACTGGT
GAGTACTCAA CCAAGTCATT CTGAGAATAG TGTATGCGGC GACCGAGTTG CTCTTGCCCG
GCGTCAATAC GGGATAATAC CGCGCCACAT AGCAGAACTT TAAAAGTGCT CATCATTGGA
AAACGTTCTT CGGGGCGAAA ACTCTCAAGG ATCTTACCGC TGTTGAGATC CAGTTGATG
TAACCCACTC GTGCACCCAA CTGATCTTCA GCATCTTTA CTTTCACCAAG CGTTCTGGG
TGAGCAAAAA CAGGAAGGCA AAATGCCGCA AAAAAGGGAA TAAGGGCGAC ACGGAAATGT
TGAATACTCA TACTCTTCTT TTTTCAATAT TATTGAAGCA TTTATCAGGG TTATTGTCTC
ATGAGCGGAT ACATATTGTA ATGTATTTAG AAAAATAAAC AAATAGGGGT TCCGCGCACA
TTTCCCCGAA AAGTGCCACC TGACGTCTAA GAAACCATTA TTATCATGAC ATTAACCTAT
AAAAATAGGC GTATCACGAG GCCCTTTCGT CTTCAC//

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. September 2000 (14.09.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/53229 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12N 15/62**, 15/54, 9/10, A61K 47/48

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP00/01899**

(22) Internationales Anmeldeatum: 3. März 2000 (03.03.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität: 199 10 102.7 8. März 1999 (08.03.1999) DE

(71) Anmelder und
(72) Erfinder: **FISCHER, Markus** (DE/DE); Ruppertstrasse 10, D-80337 München (DE). **BACHER, Adelbert** (DE/DE); Königsbergerstrasse 74, D-85748 Garching (DE).

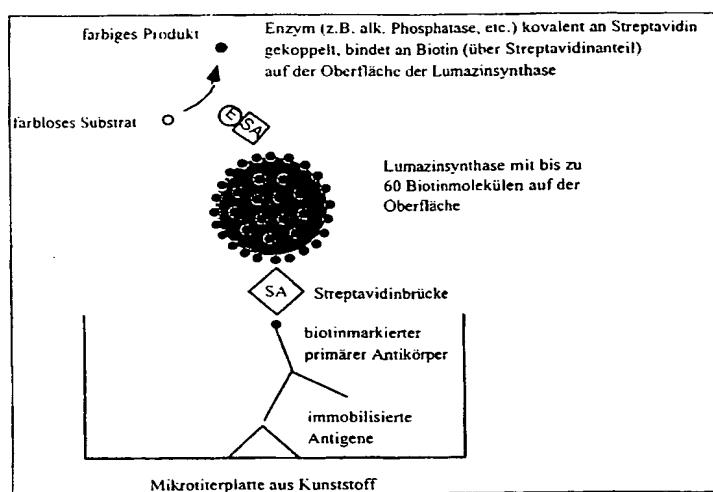
(74) Anwalt: **HARTZ, Nikolai**; Wächtershäuser & Hartz, Tal 29, D-80331 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: PROTEIN CONJUGATES ON THE BASIS OF LUMAZINE SYNTHASE, METHODS FOR PRODUCING THEM AND THE USE THEREOF

(54) Bezeichnung: PROTEINKONJUGATE AUF BASIS VON LUMAZINSYNTASE. VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG UND DEREN VERWENDUNG



- 1...COLOR PRODUCT
- 2...COLORLESS SUBSTRATE
- 3...ENZYME (E.G.ALK.PHOSPHATASE, ETC) COVALENTLY BOUND TO STREPTAVIDIN BINDS TO BIOTIN (VIA STREPTAVIDIN PORTION) ON THE SURFACE OF THE LUMAZINE SYNTHASE.
- 4...LUMAZINE SYNTHASE WITH UP TO 60 BIOTIN MOLECULES ON THE SURFACE.
- 5...STREPTAVIDIN BRIDGE
- 6...STREPTAVIDIN BRIDGE
- 7...BIOTIN-LABELED PRIMARY ANTIBODY
- 8...IMMOBILIZED ANTIGEN
- 8...MICROTITER PLATE FROM SYNTHETIC MATERIAL

(57) Abstract: The invention relates to protein conjugates, methods, vectors, proteins and DNA for producing them, their use, and medicaments and vaccines containing a certain quantity of said protein conjugates. According to the invention, supramolecular particles are produced that represent one or more different, randomly selectable structural units in a large number on the surface of an individual, approximately spherical protein molecule. Icosahedral lumazine synthases are used as carrier proteins for peptides or proteins. A DNA fragment that encodes a peptide molecule is fused with a DNA fragment that encodes an icosahedral lumazine synthase by molecular-biological methods. Said DNA fragment is inserted into a cloning vector and transformed with an appropriate host strain. A polypeptide is expressed by gene expression. If certain peptide structures are used as the fusion partners, a post-translational change of said structures can be observed in the host strain. The chimeric peptide is purified and chemically modified if necessary. It is possible to produce icosahedral molecules that contain up to 120 different peptide motifs on their surfaces by mixing. The compounds produced lend themselves as auxiliary agents for carrying out analytical methods (ELISA, biosensors) or for producing vaccines.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 00/53229 A3



(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:

29. November 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Proteinkonjugate, Verfahren, Vektoren, Proteine und DNA zu deren Herstellung, sowie deren Verwendung, sowie Arzneimittel oder Impfstoffe mit einem Gehalt derselben. Sie dient zur Herstellung supramolekularer Partikel, welche eine oder mehrere unterschiedliche, willkürlich bestimmbarer Struktureinheiten in grosser Anzahl auf der Oberfläche eines einzelnen, etwa kugelförmigen Proteinmoleküls präsentieren. Ikosaedrische Lumazinsynthasen werden als Trägerproteine für Peptide bzw. Proteine eingesetzt. Ein DNA-Fragment, welches für ein Peptidmolekül kodiert, wird unter Verwendung molekularbiologischer Verfahren mit einem DNA-Fragment, welches für eine ikosaedrische Lumazinsynthase kodiert, fusioniert. Das DNA-Fragment wird in einen Klonierungsvektor inseriert und in einen geeigneten Wirtsstamm transformiert. Auf dem Wege der Genexpression wird ein Polypeptid produziert. Bei der Verwendung von bestimmten Peptidstrukturen als Fusionspartner erfolgt im Wirtsstamm eine posttranskriptionale Veränderung derselben. Das chimiäre Peptid wird gereinigt und bei Bedarf chemisch verändert. Des Weiteren können durch Vermischung ikosaedrische Moleküle hergestellt werden, die bis zu 120 unterschiedliche Peptidmotive auf deren Oberfläche enthalten. Die entstandenen Verbindungen eignen sich als Hilfsmittel zur Durchführung von Analysenverfahren (ELISA, Biosensoren) oder zur Herstellung von Impfstoffen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00/01899

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/62 C12N15/54 C12N9/10 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, CANCERLIT, CHEM ABS Data, DISSERTATION ABS, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y,P	GOLDBAUM, FERNANDO A. ET AL: "The 18-kDa cytoplasmic protein of Brucella species - an antigen useful for diagnosis - is a lumazine synthase" J. MED. MICROBIOL., VOL. 48, NO. 9, PAGE(S) 833-839, September 1999 (1999-09), XP000938445 page 835, right hand column, last paragraph; table 1 page 834 ---	1-5,8, 11-21, 28,31, 34,46-53
P,X	WO 99 27128 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP) 3 June 1999 (1999-06-03)	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
P,Y	page 17, line 3 - line 10 ---	15,18,19

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 November 2000

Date of mailing of the international search report

18.12.00

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office

Authorized officer

Dullaart, A

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00/01899

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 99 26651 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP) 3 June 1999 (1999-06-03)	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
Y	page 17, line 27 - page 18, line 2 claims 1-11 ---	15,18,19
P,X	WO 99 38986 A (NOVARTIS ERFINDUNGEN VERWALTUN ;NOVARTIS AG (CH); GUYER CHARLES DA) 5 August 1999 (1999-08-05)	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
Y	example 7 ---	15,18,19
Y	WO 98 18917 A (FULLER TROY E ;MULKS MARTHA H (US); THACKER BRAD J (US); IOWA STAT) 7 May 1999 (1998-05-07)	1-5,8, 11-21, 28,31, 34,46-53
Y	figures ---	
Y	BACHER A ET AL: "Biosynthesis of riboflavin: lumazine synthase and riboflavin synthase." METHODS IN ENZYMOLOGY, 1997, VOL. 280, PART J, PAGE(S) 389-399, XP000938442 page 394 page 395, last paragraph - page 396, line 11 ---	1-5,8, 11-21, 28,31, 34,46-53
Y	RITSERT KARL ET AL: "Studies on the lumazine synthase/riboflavin synthase complex of <i>Bacillus subtilis</i> : Crystal structure analysis of reconstituted, icosahedral beta-subunit capsids with bound substrate analogue inhibitor at 2.4 A resolution." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 253, no. 1, 1995, pages 151 - 167, XP000929904 ISSN: 0022-2836 abstract figures 5-9 page 159, right hand column figures 11-14 ---	1-5,8, 11-21, 28,31, 34,46-53
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00/01899

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>BACHER A ET AL: "Biosynthesis of riboflavin: Structure and mechanism of lumazine synthase." BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, vol. 24, no. 1, 1996, pages 89 - 94, XP000929906</p> <p>656th Meeting of the Biochemical Society; Dublin, Ireland; September 11-15, 1995</p> <p>ISSN: 0300-5127</p> <p>page 89, right hand column</p> <p>page 93, left hand column</p> <p>---</p>	1-5,8, 11-21, 28,31, 34,46-53
Y	<p>CUSHMAN M ET AL: "Synthesis of 2,6-dioxo-(1H,3H)-9-N-ribitylpurine and lumazine synthase and riboflavin synthase." BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, APR 1998, VOL. 6, NO. 4, PAGE(S) 409-15, XP000938434</p> <p>abstract</p> <p>page 409, paragraph INTRODUCTION - page 410, left hand column</p> <p>table 1</p> <p>page 414, left hand column</p> <p>---</p>	1-5,8, 11-21, 28,31, 34,46-53
A	<p>DECKERT G ET AL: "THE COMPLETE GENOME OF THE HYPERTHERMOPHILIC BACTERIUM AQUIFEX AEOLICUS"</p> <p>NATURE. GB. MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, vol. 392, 26 March 1998 (26.03.98)</p> <p>pages 353-358, XP000867134</p> <p>ISSN: 0028-0836</p> <p>cited in the application</p> <p>the whole document</p> <p>---</p>	1-5,8, 11-21, 28,31, 34,46-53
Y	<p>SHERWOOD R: "PROTEIN FUSIONS: BIOSEPARATION AND APPLICATION"</p> <p>TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, GB, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, vol. 9, no. 1, 1991, pages 1-3, XP000168479</p> <p>ISSN: 0167-7799</p> <p>the whole document</p> <p>---</p>	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
Y	<p>YON J ET AL: "PRECISE GENE FUSION BY PCR"</p> <p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 17, no. 12, 26 June 1989 (26.06.89), page 4895</p> <p>XP000268572</p> <p>ISSN: 0305-1048</p> <p>the whole document</p> <p>---</p>	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
4		

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00/01899

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 876 947 A (KUDRYK BOHDAN J ET AL) 2 March 1999 (1999-03-02) examples 1,2,3B ---	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
Y	WO 96 31617 A (JOLLA INST ALLERGY IMMUNOLOG) 10 October 1996 (10.10.96) page 34, line 25 - page 35, line 8 ---	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
Y	US 5 786 179 A (FIORETTI WILLIAM C ET AL) 28 July 1998 (28.07.98) examples 1-3 ---	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
Y	WO 94 13327 A (BLACK CHRISTOPHER D V ;STERLING WINTHROP INC (US); SNOW ROBERT A () 23 June 1994 (23.06.94) example 8 ---	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
Y	GOLDBAUM F A ET AL: "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the lumazine synthase from <i>Brucella abortus</i> ." JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY, Vol. 123, no. 2, October 1998 (10.98) pages 175-178, XP000929914 ISSN: 1047-8477 abstract figures page 177 ---	15,18, 19,46-53
Y	MORTL S ET AL: "Biosynthesis of riboflavin. Lumazine synthase of <i>Escherichia coli</i> ." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, DEC 27 1996, VOL. 271, NO. 52, PAGE(S) 33201-7, XP002153694 tables 1,4 figures 1,6 ---	15,18, 19,46-53

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/EP 00/01899
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,Y	JORDAN DB ET AL: "Plant riboflavin biosynthesis. Cloning, chloroplast localization, expression, purification, and partial characterization of spinach lumazine synthase." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, JUL 30 1999, VOL. 274, NO. 31, PAGE(S) 22114-21, XP002153695 abstract figures -----	15,18, 19,46-53

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00/01899**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 1-5, 8, 11-21, 28, 31, 34 and partly 46-53 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

see supplemental sheet **ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210**

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see supplemental sheet

No additional fees are to be reimbursed as a result of the preliminary examination according to rule 40.2(e) PCT.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

1-5, 8, 11-21, 28, 31, 34 and 46-53

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.



No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP00/01899

The International Searching Authority found that this International Application contains several inventions or groups of inventions, as follows:

1. Claims Nos.: 46-53 partially, and 1-5, 8, 11-14, 16, 17, 20, 21, 28, 31, 34
Protein conjugate, comprising a lumazine synthase as the carrier protein, corresponding DNA and vectors, methods for producing them, and their uses, in relation to lumazine synthase in the general sense, except for the other subjects of the invention.
2. Claims Nos.: 46-53 partially, and 6, 33 and 36-38
Protein conjugate, comprising lumazine synthase as the carrier protein, corresponding DNA and vectors, and their uses, in relation to lumazine synthase from *Aquifex aeolicus*.
3. Claims Nos.: 46-53 partially, and 7
Protein conjugate, comprising lumazine synthase as the carrier protein, corresponding DNA and vectors, and their uses, in relation to chimeric lumazine synthase from *Bacillus subtilis* and *Aquifex aeolicus*.
4. Claims Nos.: 46-53 partially, and 9-10
Protein conjugate, comprising lumazine synthase as the carrier protein, corresponding DNA and vectors, and their uses, in relation to lumazine synthase from *Bacillus subtilis* that is modified in position 93 and/or 139.
5. Claims Nos.: 46-53 partially, and 15, 18 and 19
Protein conjugate, comprising lumazine synthase as the carrier protein, corresponding DNA and vectors, and their uses, in relation to at least 2 different protein conjugates of lumazine synthase.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP00/01899

6. Claims Nos.: 22-24

Lumazine synthase from *Bacillus subtilis* that is modified in position 93 and/or 139.

7. Claims Nos.: 25-26

Lumazine synthase from *Aquifex aeolicus*.

8. Claim No.: 27

Chimeric lumazine synthase from *Bacillus subtilis* and *Aquifex aeolicus*.

9. Claims Nos.: 46-53 partially, and 29, 30, 32, 35 and 39-45

Protein conjugate, comprising lumazine synthase as the carrier protein, corresponding DNA and vectors, and their uses, in relation to lumazine synthase from *Bacillus subtilis*.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP00/01899

Continued from box I.2

Claims Nos.: 1-5, 8, 11-21, 38, 31, 34 and 46-53 partially

Present patent claims 1-5, 8, 11-21, 28, 31, 34 and 46-53 relate to conjugates, to the mixtures thereof, to methods for producing them and to their uses, each time only partially characterized, namely by the carrier protein.

The claims therefore encompass all products etc. that contain said carrier protein, while only a small portion of such products etc. are supported in the description according to the terms of Article 5 PCT. In the present case, the patent claims lack the appropriate support and the patent application lacks the required disclosure to such an extent that a meaningful search encompassing the entire scope of protection sought seems impossible.

Also, the claims lack the required clarity under Article 6 PCT as none of claims 1-5, 8, 11-21, 28, 31, 34, 46-53 completely characterizes a protein conjugate. Even the carrier protein is not completely defined in the claims: claims 1-2 only relate to a "capsid spatial structure of the lumazine synthase type", in claim 8 said carrier protein is defined as 12 pentameric substructures the sequences of which "are preferably obtained on the basis of a comparison of a set of sequences of different lumazine synthase sequences, i.e. of sequences derived from different organisms, especially using the search algorithms according to Altschul et al. (1997)".

For this reason, the search was restricted to those parts of the claims that seemed to be supported and disclosed according to the above mentioned terms, i.e. those parts relating to the conjugates that are actually supported in the application by examples, restricted to the subjects of invention for which a search was carried out under the objection of lack of unity of the invention.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). EPO policy, when acting as an International Preliminary Examining Authority, is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case, irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report (Article 19 PCT) or during any Chapter II procedure whereby the applicant provides new claims.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/01899

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9927128 A	03-06-1999	EP	1034296 A	13-09-2000
WO 9926651 A	03-06-1999	US	6017728 A	25-01-2000
		EP	1037661 A	27-09-2000
WO 9938986 A	05-08-1999	NONE		
WO 9818917 A	07-05-1998	US	5925354 A	20-07-1999
		AU	5155098 A	22-05-1998
		CA	2241626 A	07-05-1998
		EP	0948616 A	13-10-1999
		JP	11504662 T	27-04-1999
		ZA	9709657 A	19-08-1998
US 5876947 A	02-03-1999	AU	8503898 A	16-02-1999
		EP	1007570 A	14-06-2000
		WO	9905176 A	04-02-1999
WO 9631617 A	10-10-1996	US	5807714 A	15-09-1998
		CA	2217346 A	10-10-1996
		JP	11509723 T	31-08-1999
US 5786179 A	28-07-1998	US	5747659 A	05-05-1998
		US	5725858 A	10-03-1998
		AU	704737 B	06-05-1999
		AU	2095995 A	11-09-1995
		BR	9507426 A	16-09-1997
		CA	2184183 A	31-08-1995
		CN	1149258 A	07-05-1997
		EP	0804219 A	05-11-1997
		FI	963325 A	21-10-1996
		JP	9510702 T	28-10-1997
		NO	963572 A	25-10-1996
		NZ	282981 A	26-08-1998
		PL	316628 A	03-02-1997
		WO	9522980 A	31-08-1995
WO 9413327 A	23-06-1994	AU	5984094 A	04-07-1994
		CA	2151614 A	23-06-1994
		EP	0675737 A	11-10-1995
		JP	8507750 T	20-08-1996

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/01899

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/62 C12N15/54 C12N9/10 A61K47/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, CANCERLIT, CHEM ABS Data, DISSERTATION ABS, EMBASE, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y, P	GOLDBAUM, FERNANDO A. ET AL: "The 18-kDa cytoplasmic protein of Brucella species - an antigen useful for diagnosis - is a lumazine synthase" J. MED. MICROBIOL., VOL. 48, NO. 9, PAGE(S) 833-839, September 1999 (1999-09), XP000938445 Seite 835, rechte Spalte, letzter Absatz; Tabelle 1 Seite 834 ---	1-5,8, 11-21, 28,31, 34,46-53
P, X	WO 99 27128 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP) 3. Juni 1999 (1999-06-03)	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31,
P, Y	Seite 17, Zeile 3 - Zeile 10 ---	34,46-53 15,18,19 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die dem allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

23. November 2000

18.12.00

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Dullaart, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01899

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 99 26651 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP) 3. Juni 1999 (1999-06-03)	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
Y	Seite 17, Zeile 27 -Seite 18, Zeile 2 Ansprüche 1-11 ---	15,18,19
P,X	WO 99 38986 A (NOVARTIS ERFINDUNGEN VERWALTUNG ;NOVARTIS AG (CH); GUYER CHARLES DA) 5. August 1999 (1999-08-05)	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
Y	Beispiel 7 ---	15,18,19
Y	WO 98 18917 A (FULLER TROY E ;MULKS MARTHA H (US); THACKER BRAD J (US); IOWA STAT) 7. Mai 1998 (1998-05-07)	1-5,8, 11-21, 28,31, 34,46-53
	Abbildungen ---	
Y	BACHER A ET AL: "Biosynthesis of riboflavin: lumazine synthase and riboflavin synthase." METHODS IN ENZYMOLOGY, 1997, VOL. 280, PART J, PAGE(S) 389-399, XP000938442 Seite 394 Seite 395, letzter Absatz -Seite 396, Zeile 11 ---	1-5,8, 11-21, 28,31, 34,46-53
Y	RITSERT KARL ET AL: "Studies on the lumazine synthase/riboflavin synthase complex of <i>Bacillus subtilis</i> : Crystal structure analysis of reconstituted, icosahedral beta-subunit capsids with bound substrate analogue inhibitor at 2.4 A resolution." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 253, Nr. 1, 1995, Seiten 151-167, XP000929904 ISSN: 0022-2836 Zusammenfassung Abbildungen 5-9 Seite 159, rechte Spalte Abbildungen 11-14 ---	1-5,8, 11-21, 28,31, 34,46-53
		-/-

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01899

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>BACHER A ET AL: "Biosynthesis of riboflavin: Structure and mechanism of lumazine synthase." BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, Bd. 24, Nr. 1, 1996, Seiten 89-94, XP000929906</p> <p>656th Meeting of the Biochemical Society; Dublin, Ireland; September 11-15, 1995</p> <p>ISSN: 0300-5127</p> <p>Seite 89, rechte Spalte</p> <p>Seite 93, linke Spalte</p> <p>---</p>	1-5,8, 11-21, 28,31, 34,46-53
Y	<p>CUSHMAN M ET AL: "Synthesis of 2,6-dioxo-(1H,3H)-9-N-ribitylpurine and lumazine synthase and riboflavin synthase." BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, APR 1998, VOL. 6, NO. 4, PAGE(S) 409-15, XP000938434</p> <p>Zusammenfassung</p> <p>Seite 409, Absatz INTRODUCTION -Seite 410, linke Spalte</p> <p>Tabelle 1</p> <p>Seite 414, linke Spalte</p> <p>---</p>	1-5,8, 11-21, 28,31, 34,46-53
A	<p>DECKERT G ET AL: "THE COMPLETE GENOME OF THE HYPERTHERMOPHILIC BACTERIUM AQUIFEX AEOLICUS"</p> <p>NATURE, GB, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, Bd. 392, 26. März 1998 (1998-03-26), Seiten 353-358, XP000867134</p> <p>ISSN: 0028-0836</p> <p>in der Anmeldung erwähnt</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-5,8, 11-21, 28,31, 34,46-53
Y	<p>SHERWOOD R: "PROTEIN FUSIONS: BIOSEPARATION AND APPLICATION"</p> <p>TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, GB, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, Bd. 9, Nr. 1, 1991, Seiten 1-3, XP000168479</p> <p>ISSN: 0167-7799</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
Y	<p>YON J ET AL: "PRECISE GENE FUSION BY PCR"</p> <p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, Bd. 17, Nr. 12, 26. Juni 1989 (1989-06-26), Seite 4895 XP000268572</p> <p>ISSN: 0305-1048</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
		-/-

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01899

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	US 5 876 947 A (KUDRYK BOHDAN J ET AL) 2. März 1999 (1999-03-02)	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
	Beispiele 1,2,3B ---	
Y	WO 96 31617 A (JOLLA INST ALLERGY IMMUNOLOG) 10. Oktober 1996 (1996-10-10)	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
	Seite 34, Zeile 25 -Seite 35, Zeile 8 ---	
Y	US 5 786 179 A (FIORETTI WILLIAM C ET AL) 28. Juli 1998 (1998-07-28)	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
	Beispiele 1-3 ---	
Y	WO 94 13327 A (BLACK CHRISTOPHER D V ;STERLING WINTHROP INC (US); SNOW ROBERT A () 23. Juni 1994 (1994-06-23)	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
	Beispiel 8 ---	
Y	GOLDBAUM F A ET AL: "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the lumazine synthase from <i>Brucella abortus</i> ." JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY, Bd. 123, Nr. 2, Oktober 1998 (1998-10), Seiten 175-178, XP000929914 ISSN: 1047-8477 Zusammenfassung Abbildungen Seite 177 ---	15,18, 19,46-53
Y	MORTL S ET AL: "Biosynthesis of riboflavin. Lumazine synthase of <i>Escherichia coli</i> ." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, DEC 27 1996, VOL. 271, NO. 52, PAGE(S) 33201-7, XP002153694 Tabellen 1,4 Abbildungen 1,6 ---	15,18, 19,46-53
	-/-	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01899

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, Y	<p>JORDAN DB ET AL: "Plant riboflavin biosynthesis. Cloning, chloroplast localization, expression, purification, and partial characterization of spinach lumazine synthase."</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, JUL 30 1999, VOL. 274, NO. 31, PAGE(S) 22114-21, XP002153695</p> <p>Zusammenfassung Abbildungen</p> <p>-----</p>	15,18, 19,46-53

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/01899

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. Ansprüche Nr. 1-5, 8, 11-21, 28, 31, 34 und 46-53 teilweise weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210

3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

Aufgrund des Ergebnisses der vorläufigen Überprüfung
gemäß Regel 40.2(e) PCT sind keine zusätzlichen Gebühren zu erstatten.

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
1-5, 8, 11-21, 28, 31, 34 und 46-53

4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 46-53 teilweise, und 1-5, 8, 11-14, 16, 17, 20, 21, 28, 31, 34

Protein-Konjugat, bestehend aus Lumazinsynthase als Trägerprotein, korrespondierende DNA und Vektoren, Verfahren zu deren Herstellung, und deren Verwendungen, bezogen auf Lumazinsynthase im allgemeinen Sinne, mit Ausname von den weiteren Erfindungsgegenstände.

2. Ansprüche: 46-53 teilweise, und 6, 33 und 36-38

Protein-Konjugat, bestehend aus Lumazinsynthase als Trägerprotein, korrespondierende DNA und Vektoren, und deren Verwendungen, bezogen auf Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*.

3. Ansprüche: 46-53 teilweise, und 7

Protein-Konjugat, bestehend aus Lumazinsynthase als Trägerprotein, korrespondierende DNA und Vektoren, und deren Verwendungen, bezogen auf chimäres Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* und *Aquifex aeolicus*.

4. Ansprüche: 46-53 teilweise, und 9-10

Protein-Konjugat, bestehend aus Lumazinsynthase als Trägerprotein, korrespondierende DNA und Vektoren, und deren Verwendungen, bezogen auf Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* modifiziert an Position 93 und/oder 139.

5. Ansprüche: 46-53 teilweise, und 15, 18 und 19

Protein-Konjugat, bestehend aus Lumazinsynthase als Trägerprotein, korrespondierende DNA und Vektoren, und deren Verwendungen, bezogen auf mindestens 2 unterschiedlichen Protein-Konjugaten von Lumazinsynthase

6. Ansprüche: 22-24

Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* modifiziert an Position 93 und/oder 139.

7. Ansprüche: 25-26

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*.

8. Anspruch : 27

Chimäres Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* und *Aquifex aeolicus*.

9. Ansprüche: 46-53 teilweise, und 29, 30, 32, 35 und 39-45

Protein-Konjugat, bestehend aus Lumazinsynthase als Trägerprotein, korrespondierende DNA und Vektoren, und deren Verwendungen, bezogen auf Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1-5, 8, 11-21, 28, 31, 34 und 46-53 teilweise

Die geltenden Patentansprüche 1-5, 8, 11-21, 28, 31, 34 und 46-53 beziehen sich auf Konjugate, deren Mischungen, Verfahren zu deren Herstellung, und deren Verwendung, jeweils nur teilweise charakterisiert, d.h. durch das Trägerprotein.

Die Patentansprüche umfassen daher alle Produkte etc., die dieses Trägerprotein enthalten, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Produkte etc. liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint.

Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, weil in keiner der Ansprüchen 1-5, 8, 11-21, 28, 31, 34 46-53 ein Protein-Konjugat vollständig charakterisiert worden ist.

Sogar das Trägerprotein ist nicht vollständig in den Ansprüchen definiert: in Ansprüchen 1-2 ist nur der Rede von einer "Kapsid-Raumstruktur vom Lumazinsynthase-Typ", in Anspruch 8 wird dieses Trägerprotein definiert als 12 pentamere Unterstrukturen, deren Sequenz "vorzugsweise aus dem Vergleich einer Sequenzmenge verschiedener, d.h. aus verschiedenen Organismen stammenden Lumazinsynthasesequenzen, insbesondere unter Verwendung von Suchalgorithmen nach Altschul et al. (1997), gewonnen werden".

Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend, die Konjugate, die in der Anmeldung tatsächlich mit einem Beispiel unterstützt werden, beschränkt auf die Erfindungsgegenstände, die unter dem Einwand wegen mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung gesucht worden sind.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/01899

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9927128 A	03-06-1999	EP	1034296 A	13-09-2000
WO 9926651 A	03-06-1999	US	6017728 A	25-01-2000
		EP	1037661 A	27-09-2000
WO 9938986 A	05-08-1999	keine		
WO 9818917 A	07-05-1998	US	5925354 A	20-07-1999
		AU	5155098 A	22-05-1998
		CA	2241626 A	07-05-1998
		EP	0948616 A	13-10-1999
		JP	11504662 T	27-04-1999
		ZA	9709657 A	19-08-1998
US 5876947 A	02-03-1999	AU	8503898 A	16-02-1999
		EP	1007570 A	14-06-2000
		WO	9905176 A	04-02-1999
WO 9631617 A	10-10-1996	US	5807714 A	15-09-1998
		CA	2217346 A	10-10-1996
		JP	11509723 T	31-08-1999
US 5786179 A	28-07-1998	US	5747659 A	05-05-1998
		US	5725858 A	10-03-1998
		AU	704737 B	06-05-1999
		AU	2095995 A	11-09-1995
		BR	9507426 A	16-09-1997
		CA	2184183 A	31-08-1995
		CN	1149258 A	07-05-1997
		EP	0804219 A	05-11-1997
		FI	963325 A	21-10-1996
		JP	9510702 T	28-10-1997
		NO	963572 A	25-10-1996
		NZ	282981 A	26-08-1998
		PL	316628 A	03-02-1997
		WO	9522980 A	31-08-1995
WO 9413327 A	23-06-1994	AU	5984094 A	04-07-1994
		CA	2151614 A	23-06-1994
		EP	0675737 A	11-10-1995
		JP	8507750 T	20-08-1996

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)